

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Eliška Kratochvílová**

**Fyzické interakce sestřihového faktoru Prp45**

Physical interactions of the splicing factor Prp45

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Školitel: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14.08.2015

Eliška Kratochvílová

Na tomto místě bych chtěla mnohokrát poděkovat mému školiteli Doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. za odborné vedení mého diplomového projektu, za mnoho věnovaného času a přátelský přístup, a také Doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc. za velkou ochotu a kvalifikované rady.

Velký dík patří také Mgr. Martině Hálové, Mgr. Kateřině Abrahámové, Ph.D. a RNDr. Anně Valentové za provedení prvním nahlédnutím do světa vědy, za jejich mnoho cenných rad a odbornou pomoc.

Mnohokrát děkuji také Boženě Pospíšilové a Mgr. Martině Kratochvílové za jejich ochotnou pomoc v neakademickém životě. Děkuji také manželovi a dceři za to, že tomu všemu dávají smysl.

## Abstrakt

Je známo, že posttranslační stav chromatinu, transkripce a sestřih se vzájemně ovlivňují, přesto ve studiu jejich vztahů zbývá ještě mnoho nezodpovězených otázek. V kvasince *Saccharomyces cerevisiae* lze relativně snadno navodit stavy, kdy je v životaschopných buňkách sestřih oddělen od transkripce. Takového stavu bylo docíleno mutací sestřihového faktoru Prp45, jehož savčí homolog se prokazatelně účastní jak regulace transkripce, tak sestřihových reakcí.

Na základě předem indikovaných interakcí v dvouhybridním systému byla v této práci hledána fyzická spojení proteinu Prp45 s proteiny účastnícími se posttranslačních modifikací chromatinu. Jejich nalezení by poskytlo vhled do vzájemných vztahů procesů genové exprese. Koimunoprecipitací ani afinitní purifikací nebyly nalezeny fyzické interakce mezi proteinem Prp45 a námi zvolenými regulátory chromatinu. O alternativních přístupech uvažujeme.

Koprecipitačními metodami byla dále blíže lokalizována interakce proteinu Prp46 se zkrácenými variantami proteinu Prp45. Toto pozorování rozšířilo naše znalosti o protein-proteinových interakcích v rámci sestřihového komplexu.

**Klíčová slova:** Prp45, Prp46, Prp22, protein-proteinové interakce, spliceosom, kotranskripční sestřih, chromatinové modifikace, koimunoprecipitace, afinitní purifikace, *Saccharomyces cerevisiae*



## Abstract

It is well known that chromatin posttranslational state, transcription and splicing influence each other. Nevertheless, the details of this coupling are not fully understood. In *S. cerevisiae*, it is possible to induce conditions, in which splicing is uncoupled from transcription. Such situation occurred in cells expressing a mutated splicing factor Prp45, whose human homolog has been proved to participate in transcription regulation and also in splicing reactions.

Based on previously indicated interactions in high throughput two-hybrid screens, we have been looking for physical links between Prp45 and proteins involved in chromatin posttranslational modifications. Finding of such a link would provide insight into the relationships of gene expression processes. Using coimmunoprecipitation and affinity purification, we were unable to detect physical interactions between Prp45 and our candidate chromatin regulators. Alternative approaches are discussed.

Using the precipitation techniques, we mapped the interaction of Prp46 with truncated variants of Prp45. This observation contributes to our knowledge of protein-protein interactions within the spliceosome.

**Key words:** Prp45, Prp46, Prp22, protein-protein interactions, spliceosome, cotranscriptional splicing, chromatin modifications, coimmunoprecipitation, affinity purification, *Saccharomyces cerevisiae*

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	1
1 Úvod.....	3
2 Literární přehled.....	4
2.1 Chromatin a jeho stav ve vztahu k sestřihu.....	6
2.1.1 Pozice nukleozómů v rámci genu, remodelace chromatinu.....	6
2.1.2 Acetylace.....	7
2.1.3 Ubiquitinylace.....	8
2.1.4 Methylace.....	10
2.2 Propojení transkripce se sestřihem.....	11
2.2.1 Vliv intronů v genu na transkripci.....	11
2.2.2 Doména CTD jako prostředník.....	12
2.2.3 Kinetické spřažení.....	13
2.2.4 Kotranskripční sestavování spliceosomu a jeho vliv na transkripci.....	14
2.2.5 Kotranskripční sestřihové reakce.....	17
2.3 Kandidátní proteiny regulačně spřahující chromatinové modifikace, transkripci a sestřih.....	20
2.3.1 Proteiny SNW a Prp45.....	20
2.3.1.1 SKIP v sestřihu a transkripci.....	21
2.3.1.2 Prp45 a jeho role v sestřihu.....	24
2.3.1.3 Prp45 a transkripce.....	26
2.3.2 Vybrané regulátory stavu chromatinu.....	28
3 Materiál a metody.....	30
3.1 Materiál.....	30
3.1.1 Kultivační média a roztoky.....	30
3.1.1.1 Kultivace bakterií.....	30
3.1.1.2 Kultivace kvasinek.....	30
3.1.2 Přehled použitých kvasinkových a bakteriálních kmenů.....	32
3.1.3 Přehled použitých primerů.....	34
3.1.4 Přehled použitých enzymů.....	34
3.1.5 Přehled použitých protilátek.....	35
3.1.6 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů a proteinů.....	36
3.2 Metody.....	37
3.2.1 Kultivace mikroorganismů.....	37
3.2.2 Příprava a výsev glycerolových konzervovaných kvasinkových kultur.....	37
3.2.3 Křížení a sporulace kvasinkových kmenů.....	38
3.2.4 Mikromanipulace kvasinkových tetrad po sporulaci, tetradová analýza.....	38
3.2.5 Transformace bakterií elektroporací.....	39
3.2.6 Transformace bakterií v TSS.....	40
3.2.7 Izolace plasmidů z bakterií alkalickou metodou.....	40
3.2.8 Izolace plasmidů z bakterií pomocí sady NucleoSpin® Plasmid.....	41
3.2.9 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou.....	42
3.2.10 Izolace chromozomální DNA z kvasinek.....	43
3.2.11 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami.....	44
3.2.12 Navrhování primerů.....	44
3.2.13 Amplifikace DNA pomocí PCR.....	45
3.2.14 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí NucleoSpin® Extract II.....	46

3.2.15 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu.....	46
3.2.16 Měření koncentrace DNA na spektrometru.....	47
3.2.17 Příprava proteinových extraktů z kvasinek.....	47
3.2.18 Příprava proteinových extraktů z kvasinek pro precipitaci.....	48
3.2.19 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové (Bio-Rad Protein Assay).....	50
3.2.20 Měření koncentrace proteinů dle Lowryho (DC Protein Assay).....	51
3.2.21 Koimunoprecipitace.....	51
3.2.22 Afinitní purifikace pomocí glutathion agarózy.....	53
3.2.23 Tris-glycinová SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů.....	54
3.2.24 Western blot.....	56
3.2.25 Imunodetekce proteinů na membráně.....	57
<b>4 Cíle práce.....</b>	<b>59</b>
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Tvorba dvojité značených kmenů.....</b>	<b>61</b>
5.1.1 Kmeny obsahující značky HA a GFP.....	61
5.1.1.1 Vlastní příprava kmenů.....	61
5.1.1.2 Ověřování přítomnosti značek.....	64
5.1.2 Kmeny obsahující značky GST a TAP.....	69
5.1.2.1 Vlastní příprava kmenů.....	70
5.1.2.2 Ověřování přítomnosti značek.....	74
<b>5.2 Optimalizace metod pro testování interakcí.....</b>	<b>78</b>
5.2.1 Koimunoprecipitace za značku HA a následná detekce značky GFP.....	78
5.2.2 Precipitace za značku GST a následná detekce značky TAP.....	83
<b>5.3 Testování interakce proteinu Prp22 s proteinem Prp45.....</b>	<b>93</b>
<b>5.4 Testování interakcí proteinů Ada2, Ahc1, Yta7, Ngg1, Eaf3 a Vps75 s proteinem Prp45.....</b>	<b>94</b>
<b>5.5 Testování interakcí proteinu Prp46 se zkrácenými variantami proteinu Prp45...97</b>	<b>97</b>
<b>6 Diskuze.....</b>	<b>98</b>
6.1 Metoda hledání fyzických interakcí.....	98
6.2 Charakterizace interakce Prp45 a Prp46.....	100
6.3 Interakce Prp45 s Prp22.....	102
6.4 Hledání interakcí Prp45 s regulátory transkripce.....	103
<b>7 Souhrn.....</b>	<b>106</b>
<b>8 Seznam použité literatury.....</b>	<b>107</b>
<b>9 Příloha.....</b>	<b>117</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>3' ss</b>	3' sestřihové místo ( <i>3' splice site</i> )
<b>5' ss</b>	5' sestřihové místo ( <i>5' splice site</i> )
<b>AP</b>	alkalická fosfatáza ( <i>alkaline phosphatase</i> )
<b>bp</b>	počet párů bází ( <i>base pair</i> )
<b>BP</b>	místo větvení ( <i>branch point</i> )
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
<b>CTD</b>	C-koncová doména RNA polymerázy II ( <i>C-terminal domain</i> )
<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>DTT</b>	dithiotreitol
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>GFP</b>	zelený fluorescenční protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
<b>GST</b>	glutathion S-transferáza
<b>HA</b>	hemaglutinin
<b>HAT</b>	histonacetyltransferáza
<b>LB médium</b>	Luria-Bertani médium
<b>kDa</b>	kilo Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
<b>MNáza</b>	mikrokokální nukleáza
<b>mRNA</b>	mediátorová RNA ( <i>messenger RNA</i> )
<b>OD</b>	optická denzita
<b>ORF</b>	otevřený čtecí rámec genu ( <i>open reading frame</i> )
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PEG</b>	polyethylenglykol
<b>pre-mRNA</b>	prekurzor mediátorové RNA
<b>RNAPII</b>	RNA polymeráza II
<b>rpm</b>	otáčky za minutu ( <i>revolutions per minute</i> )
<b>SDS</b>	sodiumdodecylsulfát
<b>snRNA</b>	malá jaderná RNA ( <i>small nuclear RNA</i> )
<b>snRNP</b>	komplex snRNA a proteinů
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>TAP</b>	tandemová afinitní purifikace

<b>TBS</b>	pufrovaný solný roztok ( <i>Tris-buffered saline</i> )
<b>TSS</b>	roztok pro transformaci a skladování bakterií ( <i>transformation and storage solution</i> )
<b>v/v</b>	objemová procentuální koncentrace ( <i>volume/volume</i> )
<b>w/v</b>	smíšená procentuální koncentrace ( <i>mass/volume</i> )
<b>w/w</b>	hmotnostní procentuální koncentrace ( <i>mass/mass</i> )

# 1 Úvod

Představa, že genová exprese se skládá z mnoha oddělených po sobě jdoucích procesů, je již dávno minulostí. Aktéři účastníci se jednotlivých fází tvorby výsledného proteinu z výchozího genu spolu nepochybně vzájemně komunikují a ovlivňují se. Genová exprese je tedy spíše jeden komplexní proces integrující jednotlivé své fáze skrze různé typy společných komponent. Přesto je tu řada nezodpovězených otázek. Do jaké míry k propojení různých fází dochází? K čemu takové propojení buňce je a co se stane, zruší-li se? Jak ovlivňuje kolokalizace těchto fází jejich regulační spřažení? A existují i fyziologické situace či buňky, kde jsou tyto fáze odspřaženy?

Středem zájmu v této práci je sestřih pre-mRNA (prekurzoru mediátorové RNA) a jeho souvislost s transkripcí a taktéž se stavem chromatinu. V savcích buňkách je hojně využíván alternativní sestřih, jehož studium umožnilo jednoznačně prokázat funkční propojení těchto tří procesů. Jiná situace je ovšem v pučící kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), modelovém organismu naší laboratoře. Ta využívá alternativní sestřih minimálně, čímž přichází o část komplexity tohoto propojení. I zde jsou však jednotlivé fáze genové exprese regulačně spřaženy. Zajímavé na tomto modelu studia je, že zde za určitých podmínek může sestřih proběhnout jak kotranskripčně, tak posttranskripčně, což s sebou může nést i zrušení kolokalizace. Lze ho proto využít pro studium rozdílů, jak se v těchto dvou možných průbězích fází genové exprese bude lišit vztah jejich komponent a jejich ovlivňování.

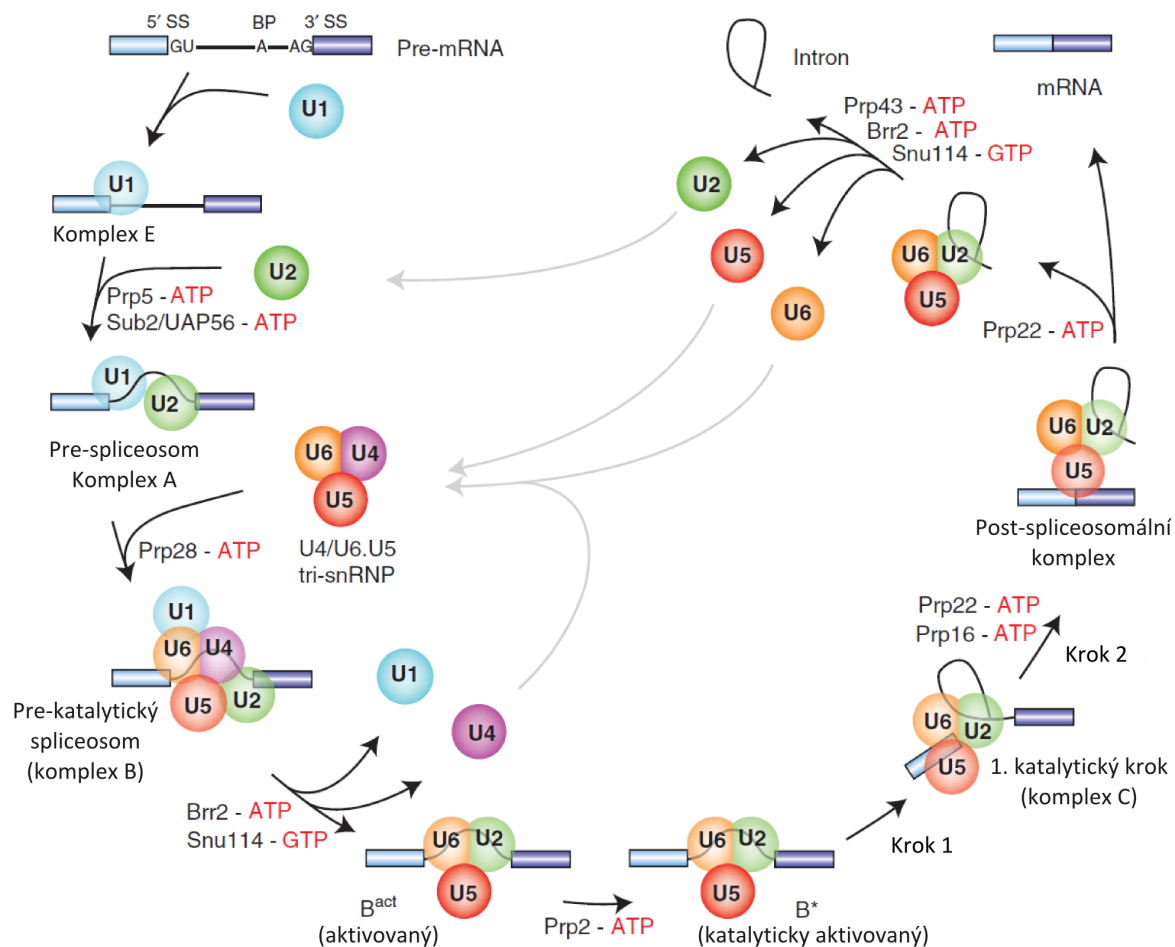
Pozornost je v této práci věnována zejména sestřihovému proteinu Prp45, jehož lidský homolog SKIP interaguje s faktory fungujícími v různých stádiích genové exprese, a je proto vhodným kandidátem pro studium jejich funkční propojenosti.

## 2 Literární přehled

Odstranění intronů z pre-mRNA může nezávisle na ostatních fázích genové exprese probíhat *in vitro*. *In vivo* je však úzce spojeno s tvorbou a dalšími úpravami transkriptu. Sestřihový komplex, spliceosom, se během sestřihu pre-mRNA několikrát výrazně přestavuje. Zjednodušené schematické znázornění přestavby snRNP (komplexů malých jaderných RNA s proteiny) v jednotlivé formy spliceosomových komplexů během sestřihových fází je na obrázku 1. Kromě komplexů snRNP je součástí většiny forem spliceosomu také proteinový komplex NTC, který hraje roli zejména v katalytických krocích sestřihu. Evolučně konzervované RNA ATPázy, helikázy a GTPáza pak zajišťují přestavování sestřihového aparátu, což umožňuje průběh dvou transesterifikačních reakcí vedoucích k vystřižení intronu a spojení exonů.

Studium sestřihu i dalších dějů v kvasince *S. cerevisiae* je oproti metazoálnímu modelu značně zjednodušeno díky malému množství proteinů, které u ní po asi 900 milionech let reduktivní evoluce zůstalo zachováno. To umožňuje studovat základní regulační a operační mechanismy v mnohem méně komplexním systému, než je ten metazoální. Důsledky zásahu do procesů v kvasinkové buňce se mnohem jednoznačněji projeví a díky tomu je možné snadněji vyvozovat závěry o jejich fungování. Tato kvasinka je proto ideálním modelem pro studium mechanismů, jež ovlivňují více dějů současně.

V této práci nás zajímá zejména sestřih v souvislosti s transkripcí, a také jak je tento vztah regulován posttranslačními modifikacemi chromatinu.



Obrázek 1: Zjednodušené schéma přestavování spliceosomu během sestřihu transkriptu. Modré boxy představují exony obklopující intron v podobě tenké čáry. 3' ss resp. 5' ss jsou sestřihová místa, BP je místo větvení, které spolu s 5' ss vytvoří smyčku. Znázorněny jsou pouze interakce se snRNP (kruhy), nikoliv s proteiny, které nejsou součástí snRNP - komplex NTC tedy chybí (upraveno dle Will a Lührmann, 2011).



## 2.1 Chromatin a jeho stav ve vztahu k sestřihu

Posttranslační modifikace chromatinu, jeho remodelace, a taktéž umístění nukleozómů na DNA, mají jistě mnohem širší dosah nežli samotné řízení transkripce. Chromatin zřejmě komunikuje s mnoha úrovněmi cesty produktů DNA za vznikem výsledného proteinu. Například významná úloha regulátorů chromatinu v sestřihu byla prokázána mnoha přesvědčivými studiemi, které zároveň ukazují, že propojení stavu chromatinu se sestřihem je velmi komplexní a zahrnující více faktorů a modifikací.

### 2.1.1 Pozice nukleozómů v rámci genu, remodelace chromatinu

Histony se sestřihem spojuje u metazoi dobře prokázaný fakt, že hustota nukleozómů se v rámci genu liší v oblasti intronů a exonů. V první studii, která poukázala na propojení sestřihu s chromatinem, bylo pozorováno, že vzdálenost mezi po sobě jdoucími 5' a 3' sestřihovými místy vykazuje periodicitu, která se podobá délce DNA potřebné pro zabalení do nukleozómů (Beckmann a Trifonov, 1991). Nabohacení nukleozómů v oblastech exonů v porovnání s intronovými oblastmi pak bylo současně pozorováno více autory u člověka, *Caenorhabditis elegans* nebo *Drosophila melanogaster* (Andersson *et al.*, 2009, Nahkuri *et al.*, 2009, Schwartz *et al.*, 2009, Spies *et al.*, 2009, Tilgner *et al.*, 2009). Nukleozómy jsou tedy nepochybně preferenčně umisťovány na vnitřní exony, nezávisle na obsahu CG párů, konzervovanosti nebo míře exprese (Nahkuri *et al.*, 2009).

Prokázána byla také souvislost sestřihu s remodelacemi chromatinu. Prvním nalezeným účastníkem sestřihu mezi chromatinovými remodelátory byl komplex SWI/SNF. Ten reguluje alternativní sestřih – kromě snižování rychlosti elongace transkripce podporuje také zahrnutí alternativních exonů některých transkriptů do výsledné mRNA (mediátorové RNA) a asociuje s několika komponentami spliceosomu, pravděpodobně tedy spolupracuje na vyvazování spliceosomu na alternativní sestřihová místa (Batsché *et al.*, 2006; vliv elongace transkripce na alternativní sestřih je popsán v kapitole 2.2.3).

Celogenomovou studií byl dále u *S. cerevisiae* objeven vliv mnoha dalších faktorů, účastnících se remodelace chromatinu, na sestřih. Na základě pozorování, že tyto faktory neovlivňovaly množství mRNA spliceosomálních komponent v buňce, autoři zamítli možnost,

že by se jednalo pouze o vliv na úrovni regulace exprese sestřihových faktorů (Albulescu *et al.*, 2012).

Zjištění, že mutace dalších chromatinových remodelátorů způsobují akumulaci nesestřižených pre-mRNA a také snížení hladiny snRNA (malé jaderné RNA) U6 v buňce, taktéž poukázalo na roli remodelace chromatinu v sestřihu (Düring *et al.*, 2012).

Současně s analýzou distribuce nukleozómů v rámci genu bylo u člověka pozorováno i nabohacení některých histonových modifikací ve vnitřních exonech, jež záviselo na míře exprese (Andersson *et al.*, 2009, Schwartz *et al.*, 2009, Spies *et al.*, 2009, Tilgner *et al.*, 2009, Dhami *et al.*, 2010). Histonové modifikace, jež byly spojeny se sestřihem, jsou uvedeny v následujících podkapitolách.

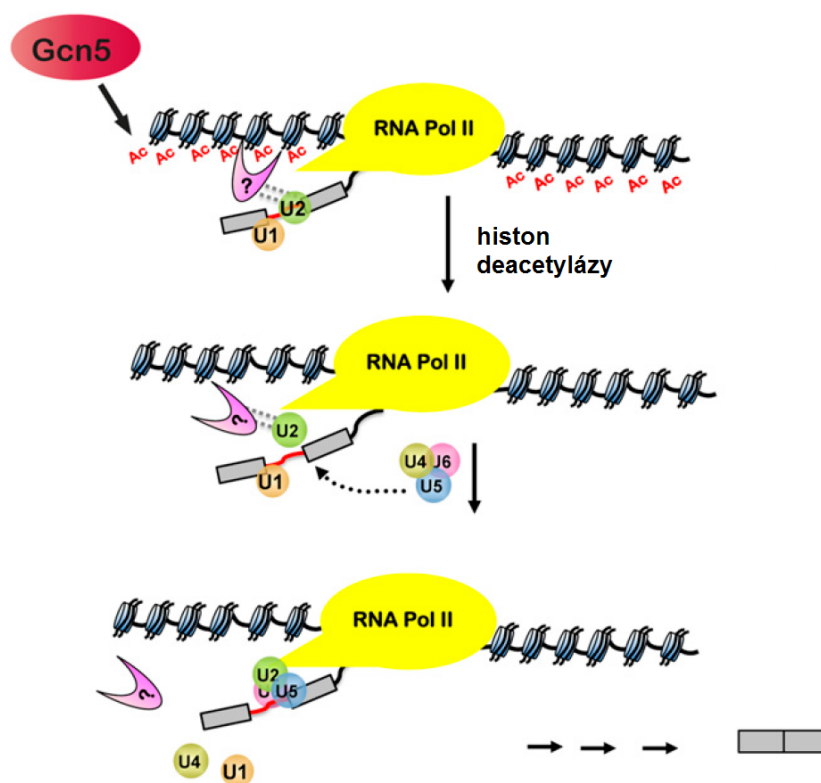
### 2.1.2 Acetylace

Podrobně prostudován byl vliv dynamiky acetylačních stavů histonu H3 na kotranskripční sestavování spliceosomu v *S. cerevisiae*, a ukázal se být velmi významným (Obr 2). Histon acetyltransferáza (HAT) Gcn5, což je transkripční koaktivátor a součást komplexu SAGA (Grant *et al.*, 1997, Ruiz-García *et al.*, 1997, Ginsburg *et al.*, 2009), totiž geneticky interaguje s proteiny snRNP U2 - její delece v kombinaci s delecí genů pro tyto sestřihové faktory způsobuje silný růstový defekt. HAT aktivita Gcn5 je také nutná pro kotranskripční vyvazování U2 na místo BP (místo větvení) (Gunderson *et al.*, 2009). Stejný defekt byl pozorován při mutaci lysinových zbytků acetylovaných Gcn5 – lysinu 9 a lysinu 14 – v kombinaci s delecí stejných sestřihových faktorů. V kotranskripčním vyvazování U2 na BP tedy hraje roli acetylce těchto zbytků komplexem SAGA. V souladu s těmito výsledky bylo dále zjištěno, že delece deacetyláz, jejímž důsledkem je zvýšena acetylce histonu H3, má za následek naopak přetrvávání snRNP U2 v místě BP a porušení jejich následné výměny za další snRNP (Gunderson *et al.*, 2011).

U člověka bylo dále pozorováno, že aktivita deacetyláz histonu H4 ovlivňuje volbu sestřihového místa při alternativním sestřihu (Hnilicová *et al.*, 2011).

Vliv acetylce histonů na alternativní sestřih byl ukázán také na myších neuronech studiem savčích RNA-vazebných proteinů Hu regulujících sestřih. Ty asociují s pre-mRNA na sekvencích obklopujících alternativní exon, a zároveň způsobují lokální hyperacetylaci histonů, což vede k zrychlení elongace transkripce v tomto místě a k nižší pravděpodobnosti

zahrnutí alternativních exonů do výsledné mRNA (vliv rychlosti elongace transkripce na alternativní sestřih bude dále popsán v kap. 2.2.3). Tyto proteiny Hu navíc inhibují aktivitu histon deacetyláz. To vedlo autory k závěru, že sestřihové regulátory zřejmě aktivně ovlivňují posttranslační stav chromatinu (Zhou *et al.*, 2011).

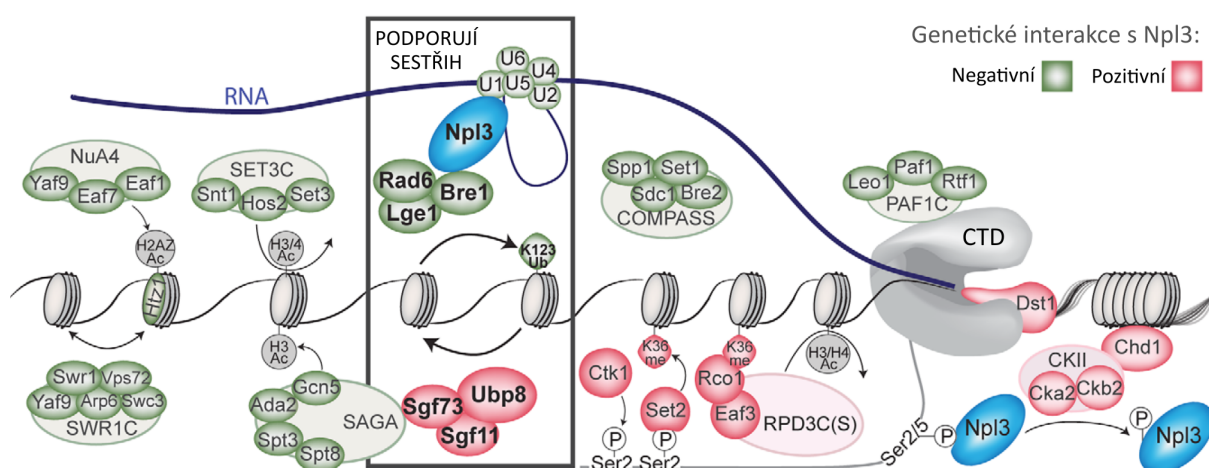


Obrázek 2: Navržený model dynamiky acetylace a deacetylace histonů v souvislosti se sestavováním spliceosomu. Gcn5 acetyluje histony, což umožní vazbu faktoru, který zprostředkuje kotranskripční vyvázání snRNP U2. Deacetylace histonů v další fázi umožní odvázání U2 a sestavení spliceosomu (upraveno dle Gunderson *et al.*, 2011).

### 2.1.3 Ubiquitinylace

Propojení mezi monoubiquitinylací lysinu 123 na histonu H2B a sestřihem bylo v *S. cerevisiae* prostudováno na proteinu Npl3. Tento protein se účastní kotranskripčního sestřihu na úrovni vyvazování snRNP U1 a U2 (Kress *et al.*, 2008). Byly také nalezeny jeho genetické interakce s enzymy monoubiquitinylujícími a deubiquitinylujícími histon H2B (obrázek 3), konkrétně s ubiquitinylačním komplexem Rad6 a deubiquitinylázou Upb8. S E3 ubiquitin ligázou Bre1, která je součástí komplexu Rad6, navíc Npl3 interaguje fyzicky

interakcí nezprostředkovanou RNA. V buňkách postrádajících Npl3 je zvýšeno narušení sestřihu při současné nepřítomnosti Bre1, Upb8 nebo při mutaci v ubiquitylaci H2B. Delece ubiquitylasy Bre1 navíc sama o sobě způsobuje mírné narušení sestřihu některých transkriptů. Bre1 také geneticky interaguje s více sestřihovými faktory. Tyto výsledky tedy ukazují na existenci propojení mezi ubiquitylací histonu H2B a sestřihem (Moehle *et al.*, 2012).



Obrázek 3: Přehled faktorů, ovlivňujících chromatin a transkripci, které geneticky interagují s Npl3. Fyzická interakce Npl3 byla prokázána s Bre1 a U1. CTD je C-koncová doména velké podjednotky RNA polymerázy II, šedé ovály představují netestované interakce (upraveno dle Moehle *et al.*, 2012).

Tato ubiquitylace je u *S. cerevisiae* kromě toho nabohacena zejména kolem 3' konců intronů, vyznačuje tedy rozmístění intronů v rámci genu. Její narušení mění také intragenovou distribuci trimethylace lysinu 36 na histonu H3, která je zapojena do volby sestřihového místa v alternativním sestřihu (viz níže). Nepřítomnost této monoubiquitylace v kombinaci s delecí některých komponent snRNP U2 navíc vede k syntetické letalitě. Monoubiquitylace lysinu 123 na histonu H2B tedy moduluje rozmístění některých histonových modifikací na exonech a intronech a zprostředkovává tak propojení mezi chromatinem a sestřihem (Shieh *et al.*, 2011).

Ve shodě s předchozími výzkumy bylo pozorováno, že stejná monoubiquitylace histonu H3 kontroluje vyvazování Npl3, snRNP U1 a U2 na transkript a ovlivňuje tak účinnost sestřihu. Na vyvazování těchto faktorů zároveň nemá vliv methylace histonu H3, která je ubiquitylací řízena (Hérissant *et al.*, 2014).

## 2.1.4 Methylace

Ve vůbec první práci, která poukázala na souvislost histonových modifikací se sestřihem, se autoři zabývali opět rozdílnou distribucí chromatinových značek v rámci genu, a to u člověka, myši a *Caenorhabditis elegans*. Zjistili, že trimethylace histonu H3 na lysinu 36 je nabohacena v oblasti exonů. O něco nižší je pak na exonech podléhajících alternativnímu sestřihu (Kolasinska-Zwierz *et al.*, 2009).

V lidských buňkách byl přímý vliv této trimethylace na volbu sestřihového místa při alternativním sestřihu následně skutečně prokázán. Zvýšení této trimethylace totiž zvýšilo pravděpodobnost vystřížení alternativního exonu, její snížení zase podporovalo zahrnutí tohoto exonu do výsledné mRNA (Luco *et al.*, 2010).

Naopak existenci zpětného toku komunikace mezi chromatinem a sestřihem naznačilo zjištění, že inhibice sestřihu snižuje tuto trimethylaci, naproti tomu jeho aktivace trimethylaci zvyšuje. Na základě těchto pozorování se autoři domnívají, že sestřih ovlivňuje modifikace histonů (de Almeida *et al.*, 2011). Současně, odstranění některých 3' ss v reportérovém genu, stejně jako celková inhibice sestřihu, vedly ke změně rozmístění trimethylace histonu H3 na lysinu 36. Tento poznatek by také odpovídal představě, že kotranskripční sestřih ovlivňuje histonové modifikace (Kim *et al.*, 2011).

Na lidských buňkách bylo také ukázáno, že na sestřih má vliv rovněž trimethylace histonu 3 na lysinu 4. Tuto trimethylaci rozpoznává protein CHD1, který zároveň tvoří stabilní komplex s komponenty snRNP U2. Jestliže je v buňce sníženo množství proteinu CHD1 nebo míra trimethylace lysinu 4 histonu H3, sníží se asociace snRNP U2 s chromatinem a taktéž celková účinnost sestřihu *in vivo*. Tato trimethylace tedy také usnadňuje vyvazování sestřihových komponent (Sims *et al.*, 2007).

Dle dalších autorů porucha methylace lysinu 4 a nebo 36 na histonu H3 u kvasinek způsobuje akumulaci některých pre-mRNA v buňce (Hérissant *et al.*, 2014).

Není tedy pochyb, že sestřih komunikuje s různými druhy histonových značek, přičemž každá značka může mít na sestřih různých transkriptů jinak výrazný vliv či může ovlivňovat sestřih jiným způsobem, ale taktéž sestřih může ovlivňovat stav chromatinu.

## 2.2 Propojení transkripce se sestřihem

O kotranskripčním průběhu sestřihu u metazoi víme již velmi dlouho – od roku 1988, kdy byl sestřih na nascentním transkriptu pozorován pod elektronovým mikroskopem (Beyer a Osheim, 1988).

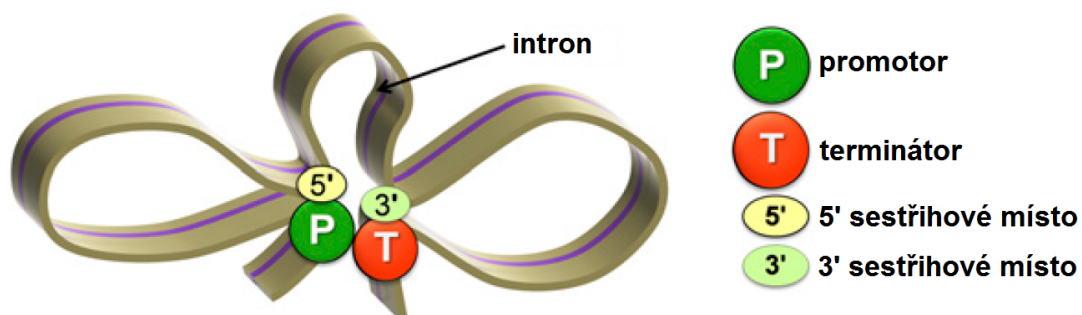
Na *S. cerevisiae* bylo také ukázáno, že k sestřihu dochází asi v době, kdy se RNAPII (RNA polymeráza II) nachází přibližně 1000 bp (párů bazí) po směru transkripce od pozice kódující 3' ss, což naznačuje, že většina kvasinkových intronů je rozpoznávána kotranskripčně (Lacadie *et al.*, 2006).

Kotranskripční průběh sestřihu v *S. cerevisiae* však není nutnou podmínkou jeho zdárného dokončení. Význam spřažení těchto dvou procesů je nepochybně zejména regulační. Co všechno vede k odpřažení transkripce a sestřihu a jaké má toto odpřažení důsledky, je stále žhavým tématem pro studium genové exprese.

V této kapitole jsou uvedeny některé důležité studie týkající se propojení sestřihu a transkripce a s tím souvisejícího vzájemného ovlivňování.

### 2.2.1 Vliv intronů v genu na transkripci

V genomu *Saccharomyces cerevisiae* se nachází asi 6000 genů, z nichž jen asi 280 obsahuje introny a pouze několik z nich obsahuje více než jeden intron. Nicméně intronové geny tvoří přibližně 27% všech syntetizovaných transkriptů v buňce (Spingola *et al.*, 1999, Ares *et al.*, 1999, Lopez a Séraphin, 1999, Barras a Beggs, 2003). Nabízí se tedy domněnka, že introny mají stimulační vliv na transkripci. Skutečně, bylo velmi brzy postulováno, že tyto sestřihové signály hrají přímou roli v „pohánění“ transkripce – odstranění intronů z kvasinkových genů totiž způsobilo snížení transkripce (Furger *et al.*, 2002). V souladu s tímto zjištěním došla další studie k výsledku, že vložení intronu do bezintronového genu transkripci zvýšilo. Pro aktivaci transkripce je konkrétně vyžadována schopnost daného intronového genu tvořit smyčku, ve které fyzicky interaguje promotor s terminátorem, a dále promotor s 5' sestřihovým místem a terminátor s 3' ss (obrázek 4). Schopnost tvořit tuto smyčku však nemá vliv na sestřih (Moabbi *et al.*, 2012).



Obrázek 4: Model smyčky na intronovém genu (převzato a upraveno z Moabbi et al., 2012).

V této souvislosti dává smysl taktéž poznatek, že snRNP U1 je u kvasinek nabohacena pouze na transkripčně aktivních genech obsahujících intron, přičemž její akumulace koreluje s pozicí intronů a je závislá na jejich přítomnosti. To naznačuje, že introny jsou nutné pro kotranskripční vyvazování a přetrvání U1 na DNA (Kotovic *et al.*, 2003). U lidských buněk se ale snRNP U1 akumuluje i na bezintronových genech. Pouze na genech obsahujících introny se akumuluje ostatní sestřihové komponenty, a to tím více, čím více intronů je přítomno – tedy na jednom transkriptu může být navázáno i více spliceosomálních komplexů (Brody *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Doména CTD jako prostředník

Studium fyzického propojení transkripce a sestřihu odhalilo, že v mnoha případech toto spojení zprostředkovává doména CTD (*C-terminal domain*) velké podjednotky RNAPII, kde se vyskytují heptapeptidové repetice. Fosforylace těchto repetic na serinech 2 a 5 ovlivňují její funkci v transkripci.

Jedním z prvních nálezů přičítajících doméně CTD úlohu v propojení transkripce se sestřihem bylo zjištění, že *in vitro* interaguje s tzv. SR (*serine/arginine-rich*) proteiny zapojenými do sestřihu (Corden a Patturajan, 1997, Das *et al.*, 2007), i když později se zjistilo, že tato interakce je citlivá na RNázy, z čehož lze usuzovat, že interakce je spíše zprostředkovaná transkriptem (Sapra *et al.*, 2009).

První přímý důkaz fyzické interakce domény CTD RNAPII se sestřihovým faktorem byl přinesen v roce 2000. Jednalo se o interakci s proteinem Prp40 *S. cerevisiae* (Morris a Greenleaf, 2000), která byla navíc specifická pouze pro CTD fosforylovanou na serinech 2 i 5, což je forma typická pro elongační fázi transkripce (Phatnani a Greenleaf, 2004).

Specifické interakce domény CTD doprovázené funkčním spojením se sestřihem byly ukázány na lidských genech *in vitro* se sestřihovými faktory U2AF65 a komplexem NTC, jejichž prostřednictvím doména CTD podporuje sestřih. U2AF65 se totiž váže přímo na fosforylovanou CTD, a to vede ke zvýšenému vyvazování U2AF65 a komplexu NTC na pre-mRNA (David *et al.*, 2011).

Ovlivnění sestřihu touto doménou bylo velmi časně naznačeno studií, kde zkrácení CTD vedlo k defektům v sestřihu a dalších úpravách transkriptu (McCracken *et al.*, 1997).

Domněnku o funkčním spřažení dále podpořilo pozorování v souladu s výše uvedenými, že účinnost počátečních fází sestřihu je *in vitro* ovlivněna posttranslačními modifikacemi CTD – hyperfosforylovaná forma sestřih pohání, hypofosforylovaná ho inhibuje (Hirose *et al.*, 1999).

Při analýze sestřihu *in vitro* byla také objevena schopnost CTD domény i mimo kontext celého proteinu RNAPII aktivovat sestavení spliceosomu a sestřih, ale pouze na substrátech obsahujících kompletní exony s 3' i 5' sestřihovými místy (Zeng a Berget, 2000).

Mutace CTD na serinech 2, znemožňující jejich fosforylaci, vedla kromě zpomalení transkripce také k poruše vyvazování sestřihových faktorů U2AF65 a snRNA U2 na místa transkripce *in vivo*, což přineslo přímý důkaz o roli CTD v zajištění kotranskripčního průběhu sestřihu (Gu *et al.*, 2013). V souladu s tímto poznatkem bylo i ukázáno, že inhibice fosforylace CTD u *Xenopus laevis* zablokovala kotranskripčně probíhající sestřih, na posttranskripční sestřih ale neměla vliv (Bird *et al.*, 2004).

### 2.2.3 Kinetické spřažení

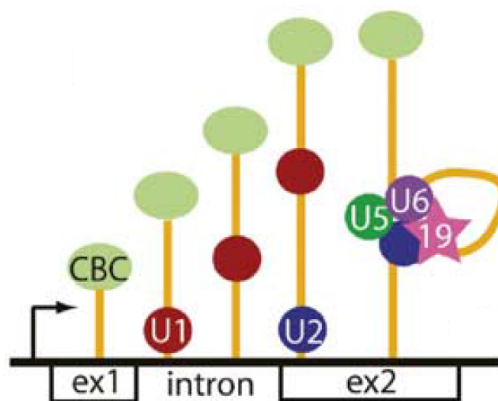
Na základě dosavadních výsledků byl navržen model tzv. „kinetického spřažení“ sestřihu a transkripce, ve kterém délka průběhu jednoho procesu ovlivní druhý proces. U metazoi se tento model týká alternativního sestřihu, kdy rychlost elongace transkripce ovlivňuje rozpoznání slabšího bližšího 3' sestřihového místa. To je rozpoznáno, jestliže se polymeráza posunuje po templátu dostatečně pomalu; je tak otevřeno tzv. „okno příležitosti“ (*window of opportunity*), během kterého se na bližším 3' ss sestaví funkční spliceosom dříve, než je rozpoznáno vzdálenější silnější 3' ss. To vede k zahrnutí alternativního exonu (Peterson *et al.*, 2002, de la Mata *et al.*, 2003, Howe *et al.*, 2003, Kornblihtt *et al.*, 2004, Perales a Bentley, 2009). U *S. cerevisiae* bylo ale také zjištěno, že v případě mnoha genů rychlá elongace transkripce RNAPII vede ke snížení účinnosti sestřihu a pomalá elongace naopak



k jejímu zvýšení. Jedná se tedy o negativní korelaci rychlosti transkripce a účinnosti sestřihu. Rozdílných rychlostí elongace transkripce bylo dosaženo mutacemi RNAPII, zpomalení RNAPII a v jeho důsledku zvýšení účinnosti sestřihu způsobila ale také delece transkripčního regulátoru Sub1 (Braberg *et al.*, 2013, Moehle *et al.*, 2014).

## 2.2.4 Kotranskripční sestavování spliceosomu a jeho vliv na transkripci

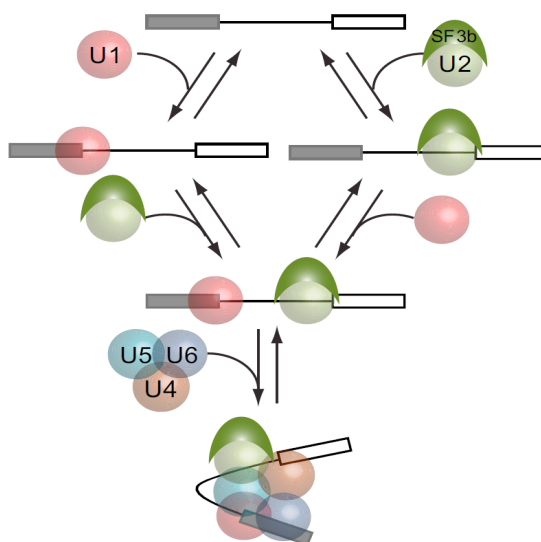
*In vivo* bylo pozorováno, že spliceosom je sestavován na genech obsahujících introny kotranskripčně v daném sledu kroků (obrázek 5). Postupně se na transkriptu akumuluje snRNP U1, snRNP U2, poté tri-snRNP U4/U6.U5, následně je destabilizována U1 a U4. Po komplexu U4/U6.U5 přichází ještě před dokončením transkripce komplex NTC, což značí, že kotranskripčně probíhá i katalýza sestřihu. Vyvazování U2 nebo U4/U6.U5 kotranskripčně je navíc zřejmě zásadní pro uskutečnění sestřihu (Görnemann *et al.*, 2005, Lacadie a Roshbash, 2005, Tardiff a Roshbash, 2006).



Obrázek 5: Model kotranskripčního vyvazování spliceosomu na transkript: Postupně přichází snRNP U1 na 5' ss, snRNP U2 na BP, tri-snRNP U4/U6.U5, odvazuje se snRNP U1 a U4, přichází komplex NTC (hvězdička) a tvoří komplex U2/U5/U6/NTC (převzato z Görnemann *et al.*, 2005).

Počáteční fáze sestavování spliceosomu ale může probíhat dvěma možnými drahami (obrázek 6). Sestavování může započít buď U2, nebo U1. Během transkripce je nejdříve přepsán úsek 5' ss, a až poté úsek BP, takže U1 vázící se na 5' ss má teoreticky možnost se

navázat na transkript dříve než U2 vážící se na BP, nutně to ale neznamená, že se dříve vázat opravdu bude. Obě tyto dráhy zahrnují následné vyvázání tri-snRNP U4/U6.U5 a sestřih. Poměr používání těchto drah se liší mezi introny, u všech intronů jsou však obě dráhy funkční (Shcherbakova *et al.*, 2013).



Obrázek 6: Dva alternativní postupy vedoucí k sestavení spliceosomu (převzato z Shcherbakova *et al.*, 2013).

Kotranskripční sestavování spliceosomu specificky ovlivňují také transkripční elongační faktory Dst1 a Paf1 (Lacadie *et al.*, 2006) a pro jeho úspěšný průběh je navíc nutná (ale nikoliv dostačující) přítomnost CBC (*cap binding complex*). Capping 5' konce transkriptu tedy zřejmě propojuje transkripci a sestřih (Görnemann *et al.*, 2005).

Jednou z výhod kotranskripčně probíhajícího sestřihu by mohl být i stimulační efekt sestřihu na průběh transkripce:

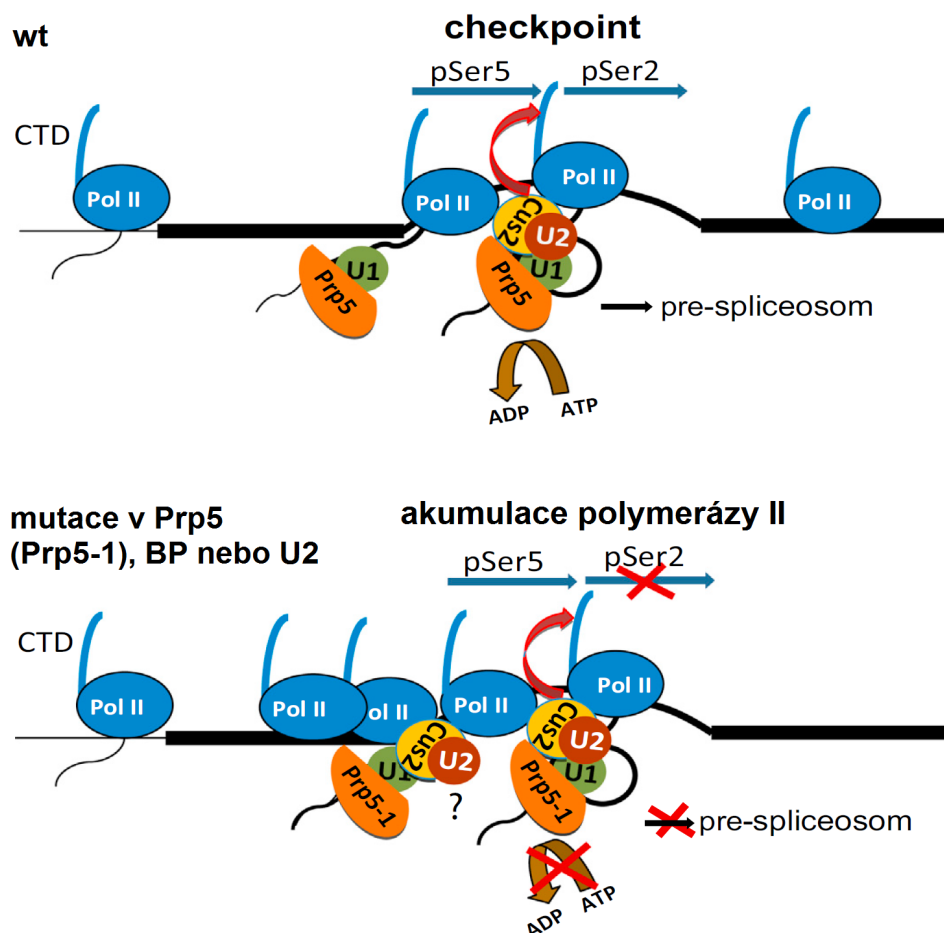
Obousměrné ovlivňování sestřihu a transkripce dokazuje např. zjištění, že SR protein je na některých genech vyžadován pro elongaci transkripce RNAPII (Fededa a Kornblihtt, 2008).

Další komponentou spliceosomu účinkující v elongaci transkripce je sestřihový komplex NTC. Jeho vyvazování na transkribované geny a interakce s RNAPII jsou nutné pro plnou transkripční aktivitu RNAPII. Komplex NTC tedy funguje přímo jako jakýsi transkripční elongační faktor (Chanarat *et al.*, 2011).

U savců byl již před delší dobou pozorován také vliv snRNP U2 na stimulaci elongace transkripce prostřednictvím interakce s elongačními faktory *in vitro* (Fong a Zhou, 2001),

jinými autory však ten stejný efekt v *S. cerevisiae in vivo* nebyl prokázán, a to ani na úrovni funkční, ani na úrovni fyzických interakcí (McKay a Johnson, 2011). Pozorování defektu v elongaci transkripce způsobeného mutací snRNA U2, která blokovala první kroky sestavování spliceosomu, však roli snRNA U2 v transkripci potvrdilo i v *S. cerevisiae in vivo* (Chathoth *et al.*, 2014).

V souladu s výše uvedenými studiemi byla recentně nadnesena hypotéza, že první kroky sestavování spliceosomu během transkripce jsou vlastně kontrolovaným mechanismem, při jehož porušení dochází k příslušné změně na transkripční úrovni. K této domněnce vedlo autory také jejich zjištění, že mutací Prp5, helicázy důležité pro první kroky sestavování spliceosomu, vzniká mimo jiné defekt v elongaci transkripce. RNAPII se při této mutaci ve fázi, kdy je její doména CTD hyperfosforylována na serinech 5, akumuluje na kvasinkových intronech *in vivo*. Obdobný defekt byl pozorován při mutaci v BP nebo v snRNP U2 blokující první kroky sestavování spliceosomu (viz výše). Defekt vzniklý mutací Prp5 v transkripci (ale nikoliv defekt v sestřihu) potlačila delece proteinu Cus2, který asociuje s U2. Cus2 tedy v tomto případě zprostředkovává pozastavení RNAPII. Vznikla tedy hypotéza o existenci jakéhosi kontrolního bodu („*checkpoint*“) elongace transkripce, v němž hraje roli Cus2 (obrázek 7; Chathoth *et al.*, 2014).



Obrázek 7: Model transkripčního „kontrolního bodu“ spřaženého se sestřihem: Za normálních podmínek (wt – divoký typ) je Cus2 odvázan a umožňuje fosforylaci RNAPII na serinech 2 a její pokračování v transkripci. Při poruchách časného sestavování spliceosomu se Cus2 nepřemístí a RNAPII se akumuluje na intronu (převzato a upraveno z Chathoth et al., 2014).

## 2.2.5 Kotranskripční sestřihové reakce

Časné sestavování spliceosomu v průběhu transkripce podporuje řada silných důkazů, poznatky o průběhu transesterifikačních sestřihových reakcí a dokončení sestřihu před ukončením transkripce jsou o něco méně jednoznačné. Obecně se má za to, že pravděpodobnější a častější děj je kotranskripčně probíhající sestřih. Tuto variantu podporuje několik studií.

Jak bylo uvedeno výše, kotranskripční sestřih u *S. cerevisiae* probíhá asi 1000 bp po transkripci úseku 3' sestřihového místa. Vzhledem k tomu sestřih u genů s běžně dlouhým druhým exonem zřejmě proběhne kotranskripčně (Lacadie et al., 2006).

Analýzou kinetiky sestřihu a úprav 3' konce mRNA bylo zjištěno, že oba kroky sestřihu probíhají před štěpením 3' konce a jeho polyadenylací, tedy kotranskripčně (Alexander *et al.*, 2010a).

Dále bylo *in vitro* pozorováno, že sestřih probíhá na transkriptu, na kterém je ještě připojena RNA polymeráza II (Yu *et al.*, 2010).

Na základě dat z kinetické analýzy transkripce reportérových genů, sestřihu transkriptů a úprav jejich 3' konce, a taktéž metodou *microarrays*, bylo zjištěno, že kotranskripční průběh sestřihu je v kvasinkách nejpravděpodobnější a nejefektivnější možností, a tedy tou dominantní, ne však jedinou (Oesterreich *et al.*, 2010, Aitken *et al.*, 2011).

Jednou z výhod kotranskripčního sestřihu by mohla být pozitivní zpětná vazba kotranskripčně probíhajícího druhého sestřihového kroku. Bylo totiž pozorováno, že narušení druhého kroku sestřihu snižuje pravděpodobnost, že první krok sestřihu proběhne kotranskripčně, a důsledkem je snížení rychlosti iniciace transkripce. Toto zjištění vypovídá o existenci „retrográdního“ funkčního propojení sestřihu a transkripce v souladu s výše uvedenými studiemi (Aitken *et al.*, 2011).

Dále bylo popsáno, že sestřih může začít probíhat po přepsání specifických sekvencí spouštějících sestavení spliceosomu na transkriptu. Rozhodnutí, že sestřih proběhne kotranskripčně, může být učiněno během transkripce od přepsání úseku kódujícího BP až po konec exonu 2 (Aitken *et al.*, 2011).

Na druhou stranu bylo pozorováno v lidských buňkách na genových konstruktech s různým počtem intronů, že kotranskripční průběh sestřihu nemá vliv na kinetiku elongace transkripce. Navíc zde byla pozorována retence polyadenylované RNA v místě transkripce po terminaci transkripce, což značí, že sestřih může u člověka proběhnout v místě transkripce po jejím ukončení bez přítomnosti RNAPII (Brody *et al.*, 2011).

Několika autory bylo dále anotováno, že v zájmu kontraskripčního průběhu sestřihu se RNAPII pozastavuje v průběhu elongace transkripce, a umožňuje tak proběhnutí sestřihu před dokončením transkripce i u genů s krátkým druhým exonem:

V lidských buňkách bylo pozorováno, že zablokování kotranskripčního sestavování spliceosomu na transkriptu způsobilo pozastavení RNAPII převážně na 3' konci genu. Naopak zabránění sestřihovým katalytickým krokům zrušilo pozastavení RNAPII a nesestřižené transkripty následně unikaly z místa transkripce. Na základě těchto zjištění se autoři domnívají, že sestřih je spřažen s terminací transkripce, a pozdější dokončení transkripce při

nedokončeném sestřihu má zabránit opouštění nezpracovaných transkriptů místa transkripce (Martins *et al.*, 2011).

Jinou skupinou autorů bylo zjištěno, že pozastavování RNAPII je specifické pouze pro geny obsahující introny a pouze pro geny, jejichž transkripty jsou účinně sestřihovány. Pozastavení RNAPII bylo lokalizováno v místě posledního exonu. Hypotetizovali proto, že pozastavení RNAPII poskytuje dostatečný čas pro proběhnutí sestřihu před terminací transkripce (Oesterreich *et al.*, 2010).

Opakovanou akumulaci RNAPII v oblastech 3' konců intronů různých reportérových a několika endogenních genů detekovali i další autoři. Toto pozastavení RNAPII bylo závislé na vyvazování snRNP U1 a U2 a na probíhající sestřihu. Pozastavení nebylo pozorováno na intronech mutovaných v 3' ss, BP nebo 5' ss. Z těchto poznatků usuzují, že tuto pauzu může způsobovat sestřihový aparát po přepsání intronů za účelem kotranskripčního průběhu sestřihu (Alexander *et al.*, 2010b).

Vzhledem ke kinetice sestřihových reakcí, které probíhají alespoň u savců v řádu minut, je jinými autory zpochybňován vliv zastavení RNAPII v řádu sekund na kotranskripční či posttranskripční povahu průběhu sestřihu (Darnell, 2013). Jestliže je však tímto pozastavením ovlivněno sestavování sestřihového komplexu, a nikoliv samotné katalytické reakce, nelze vliv pozastavení RNAPII na sestřih zpochybňovat kinetikou (Kornblihtt, 2015).

Velký potenciál pro studium všech možných typů vztahů regulace chromatinu, transkripce a jejich vlivu na sestřih má v *S. cerevisiae* protein, který bude představen v následující kapitole.

## 2.3 Kandidátní proteiny regulačně spřahující chromatinové modifikace, transkripci a sestřih

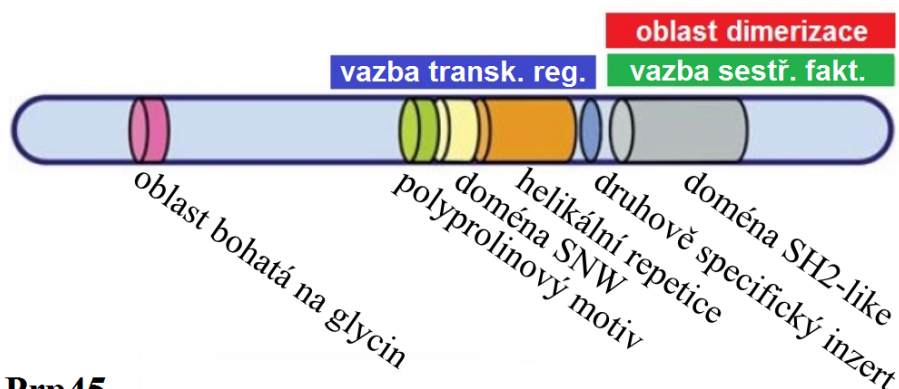
### 2.3.1 Proteiny SNW a Prp45

Protein Prp45 je esenciální jaderný protein kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nezbytný pro sestřih všech transkriptů obsahujících introny (Harris *et al.*, 1992, Albers *et al.*, 2003). Gen *PRP45* byl v *S. cerevisiae* objeven již před 25 lety a je lokalizován na chromozomu I (Diehl a Pringle, 1991). Prp45 je vysoce evolučně konzervovaný protein – patří mezi tzv. proteiny SNW a jeho taktéž esenciální homology byly identifikovány i v dalších modelových organismech a nazvány Snw1 u *Schizosaccharomyces pombe* (Ambrozková *et al.*, 2001), SnwA u *Dictyostelium discoideum* (Folk *et al.*, 1996), AtSKIP u *Arabidopsis thaliana* (Lim *et al.*, 2010), emSKIP u *Echinococcus multilocularis* (Gelmedin *et al.*, 2005), CeSKIP u *Caenorhabditis elegans* (Kostrouchova *et al.*, 2002), Bx42 u *Drosophila melanogaster* (Saumweber *et al.*, 1990), SKIP (NCoA-62) u člověka (Baudino *et al.*, 1998, Dahl *et al.*, 1998) a tak dále.

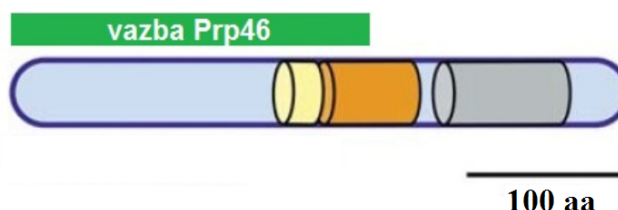
Homology proteinů SNW v různých organismech se od sebe sekvenčně příliš neliší, kvasinkový protein Prp45 je však v tomto ohledu výjimkou (obrázek 8). Na rozdíl od svých homologů postrádá zejména N-koncovou část, většinu konzervovaných vazebných motivů, a absolutně konzervovaný motiv SNWKN navíc není pro jeho esenciální funkci nezbytný (Martinkova *et al.*, 2002, Gahura *et al.*, 2009). Jeho sekvenční odlišnost naznačuje i rozdílné funkční vlastnosti. V *S. cerevisiae* se váže zejména na spliceosom (Jurica *et al.*, 2002, Gavin *et al.*, 2002, Ohi *et al.*, 2002) a sestřihové faktory (Ambrozková *et al.*, 2001), a hraje důležitou úlohu v sestřihu, kdežto jeho homology byly nalezeny také jako vazební partneři mnoha transkripčních koregulátorů a transkripčních faktorů, přičemž ale byla prokázána i jejich funkční úloha v transkripci i sestřihu (viz níže).

Někteří autoři uvádí, že i přes nižší míru vzájemné podobnosti primární struktury dokáže lidský SKIP funkčně nahradit protein Prp45 *S. cerevisiae* - buňky postrádající Prp45 a exprimující lidský SKIP jsou údajně životaschopné (Figuroa a Hayman, 2004). To by znamenalo, že esenciální funkce Prp45 v *S. cerevisiae* je tedy evolučně zachována i v jeho lidském homologovi. Tato studie však nebyla nikdy úspěšně zopakována (O. Gahura, nepublikované výsledky).

## Proteiny SNW



## Prp45



Obrázek 8: Porovnání primární struktury vysoce konzervovaných proteinů SNW a jejich odlišného homologa v *S. cerevisiae*, Prp45. Naznačena je oblast vazby transkripčních regulátorů u lidského SKIP a oblast dimerizace a vazby sestřihových faktorů u Snw1 *S. pombe*. Na Prp45 je pak znázorněna oblast vazby sestřihového faktoru Prp46 (upraveno dle Folk et al., 2004).

### 2.3.1.1 SKIP v sestřihu a transkripci

Protein SKIP působí jako funkčně velmi variabilní protein vzhledem k množství odlišných procesů, na něž byl prokázán jeho vliv. Variabilita buněčných fenotypů vzniklých následkem nefyziologické exprese či přítomností mutantních forem tohoto proteinu by mohla být ale spíše konsekvencí variability vazebné, neboť SKIP váže mnoho interakčních partnerů, jejichž funkce by mohla být závislá právě na vazbě SKIP, popřípadě vazbě jiných proteinů prostřednictvím SKIP. Skutečná esenciální funkce tohoto proteinu v buňce by tak mohla být jen jediná, a to tvorba „lešení“ zprostředkujícího proximitu nebo interakce dalších proteinů napříč různými stupni genové exprese v rámci buněčného jádra.

Tomuto podezření nahrává i zjištění, že se váže na ribonukleoproteinové struktury kolem jaderného obalu (Zhang *et al.*, 2003). Vzhledem k tomu, že byla pozorována přítomnost SKIP jak při různých fázích transkripce, tak v různých fázích sestřihu (viz níže), můžeme hypotetizovat, že tyto dva procesy jsou alespoň v některých případech funkčně a fyzicky



spřaženy právě díky SKIP. Tento protein je tedy ideální pro využití ke zjišťování míry propojení těchto dvou procesů a také pro objevování jejich dalších vzájemných spojek.

### **Vliv na iniciaci transkripce**

SKIP interaguje se sekvenčně specifickými transkripčními faktory a ovlivňuje tak iniciaci transkripce. Účastní se tedy jakožto transkripční koregulátor (nebo způsobuje svou přítomností aktivaci či inhibici) například transkripce zprostředkované jadernými receptory, jako je receptor pro vitamin D (VDR), receptor pro kyselinu retinovou a androgenní receptor (Baudino *et al.*, 1998, Dahl *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 2001, Abankwa *et al.*, 2013). O tom, zda v konkrétním případě půjde o aktivaci či represi transkripce, může rozhodovat i stav exprese proteinů jako je koaktivátor p300 nebo korepresor N-CoR, které se SKIP také interagují (Leong *et al.*, 2004). Následně SKIP ovlivňuje i sestřih mRNA některých takto indukovaných genů (Zhang *et al.*, 2003), což dále zvýrazňuje a současně konkretizuje jeho roli jakožto spojovatele transkripce se sestřihem.

SKIP dále interaguje s proteiny SMAD2 a SMAD3 v signalizaci zprostředkované faktorem TGF- $\beta$  a způsobuje tak zvýšení transkripce na promotorech závislých na této signalizaci (Leong *et al.*, 2001). V savcích transformovaných buňkách SKIP ovlivňuje transkripci genu pro proteázu degradující extracelulární matrix (MMP-9), jehož promotor je taktéž řízen signalizací TGF- $\beta$  (Villar *et al.*, 2010, Kocić *et al.*, 2012, Villar *et al.*, 2013). Vzhledem k nejednoznačným názorům autorů na základě výsledků studia tohoto procesu v různých buněčných liniích, zda se jedná o aktivační či inhibiční vliv, se nabízí domněnka, že jde opět o rozhodnutí závislé na typu dalších vazebných partnerů SKIP.

SKIP také podporuje aktivaci transkripce myogenních faktorů ve svalu (MyoD, myogenin) prostřednictvím interakce s poly(A)-vazebným proteinem PABP2 (Kim *et al.*, 2001).

SKIP se ukázal být také důležitou komponentou signální dráhy Notch vedoucí ke změně exprese genů ovlivňujících osud buňky. SKIP se zde váže na DNA-vazebný protein CBF1, v závislosti na jeho dalších interakčních partnerech je pak transkripce na promotorech řízených CBF1 aktivována či potlačena. Jestliže SKIP váže proteiny korepresorového komplexu SMRT, CIR, Sin3A a HDAC2, transkripce je reprimována (Zhou *et al.*, 2000a). SKIP ale může vázat i intracelulární část receptoru Notch, NotchIC, která kompetuje o vazbu na SKIP s korepresorovým komplexem SMRT a spol. Pokud se NotchIC váže na SKIP a CBF1, aktivuje promotory reprimované korepresorovým komplexem SMRT (Zhou *et al.*,

2000b). Alternativně může SKIP vázat také transkripční aktivátor EBNA2 viru Epstein-Barrové, v této situaci pak také dochází ke spuštění transkripce (Zhou *et al.*, 2000a).

SKIP dále interaguje s DNA-vazebným transkripčním represorem pRB a potlačuje jeho transkripčně represivní aktivitu (Prathapam *et al.*, 2002). Může také interagovat s proteinem E7 viru HPV-16, který působí proti pRB tím, že způsobuje rozpad komplexu pRB s transkripčními faktory E2F1. Ty následně spustí transkripci a dochází k buněčné transformaci. Vazba E7 na SKIP ale inhibuje aktivační vliv SKIP na transkripci (Prathapam *et al.*, 2001). Interakčními partnery SKIP jsou i přímo transkripční aktivátory E2F1 a E2F3 (Giangrande *et al.*, 2002).

Savčí SKIP dále interaguje s mnoha dalšími transkripčními regulátory – například represorem CHES1 bránícím buněčné proliferaci (Scott a Plon, 2005), aktivátorem Ski (Dahl *et al.*, 1998), korepresorem Daxx (Tang *et al.*, 2005) nebo komponentou signalizace Notch, proteinem LNX (Chen *et al.*, 2005). U *Xenopus laevis* byla potom zjištěna i jeho role v signální kaskádě Wnt, kde se váže na proteinový komplex  $\beta$ -catenin-LEF a svou vazbou reguluje aktivaci transkripce cílových genů tohoto komplexu. Zajímavé bylo i v tomto případě zjištění, že jak zvýšená, tak snížená exprese SKIP měla za následek snížení signalizace Wnt (Wang *et al.*, 2010). To bychom si mohli vysvětlovat opět jakýmsi druhem přesné regulace prostřednictvím kompetitivních vazeb inhibitorů a aktivátorů.

### **Vliv na elongaci transkripce**

Elongaci transkripce SKIP ovlivňuje prostřednictvím asociace s transkripčním elongačním faktorem P-TEFb. V rámci této signalizace pak transaktivuje protein Tat, stimuluje tak elongaci transkripce viru HIV-1 aniž by ovlivňoval iniciaci transkripce. Následně SKIP zajišťuje rozpoznání alternativního sestřihového místa na transkriptu v asociaci se sestřihovým komplexem. SKIP tedy v tomto případě hraje nezávislou roli zároveň v elongaci transkripce zprostředkované P-TEFb a v sestřihu (Brès *et al.*, 2005).

S proteinem SKIP asociují také podjednotky histon methyltransferázového komplexu c-Myc a Menin. Zde SKIP funguje jako efektor P-TEFb a vyvazuje c-Myc na promotor viru HIV-1. SKIP tudíž podporuje elongaci transkripce viru HIV-1 prostřednictvím faktorů Tat a P-TEFb i v kooperaci s proteiny c-Myc a Menin (Brès *et al.*, 2009).

Protein SKIP koaktivuje transkripci genu HES1 také tak, že spolu s Notch-IC vyvazuje faktor P-TEFb na promotor HES1 (Fryer *et al.*, 2004).

## Vliv na sestřih

Spektrum interakčních partnerů lidského SKIP také značně rozšiřuje jeho asociace se spliceosomem a sestřihovými faktory (Neubauer *et al.*, 1998, Rappsilber *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2002, Zhang *et al.*, 2003, Xu *et al.*, 2006). Důkaz o funkčním propojení proteinu SKIP se sestřihem pak přineslo zjištění, že zkrácení SKIP vedlo k akumulaci nesestřižených transkriptů v buňce (Zhang *et al.*, 2003). Jeho přítomnost byla potvrzena ve více stádiích spliceosomového komplexu, je tedy účastníkem více fází sestřihu (Jurica *et al.*, 2002, Rappsilber *et al.*, 2002, Zhou *et al.*, 2002, Bessonov *et al.*, 2008). Bylo pozorováno, že (obdobně jako jeho homolog Prp45, viz níže) je vyvazován ke spliceosomu ještě před prvním katalytickým krokem sestřihu, asociuje se snRNP U5 a po vystřižení intronu zůstává na tento vystřižený intron navázán (Makarov *et al.*, 2002).

Na studie akcentující zapojení SKIP do transkripce lze ale pohlížet i poněkud skeptičtěji. Vzhledem k tomu, že většina z nich vznikla v době, kdy studium sestřihu bylo teprve na počátku, a zároveň většinou neprokazovaly přímou protein-proteinovou interakci SKIP s regulátory transkripce, zůstává otázkou, zda je jeho zapojení v transkripci natolik významné, jak se uvádí.

Z výše uvedených zjištění nicméně vyplývá, že SKIP působí na faktory účastnící se různých stadií genové exprese - to ho staví do role vhodného kandidáta pro studium funkční propojenosti jednotlivých stupňů tohoto komplexního procesu.

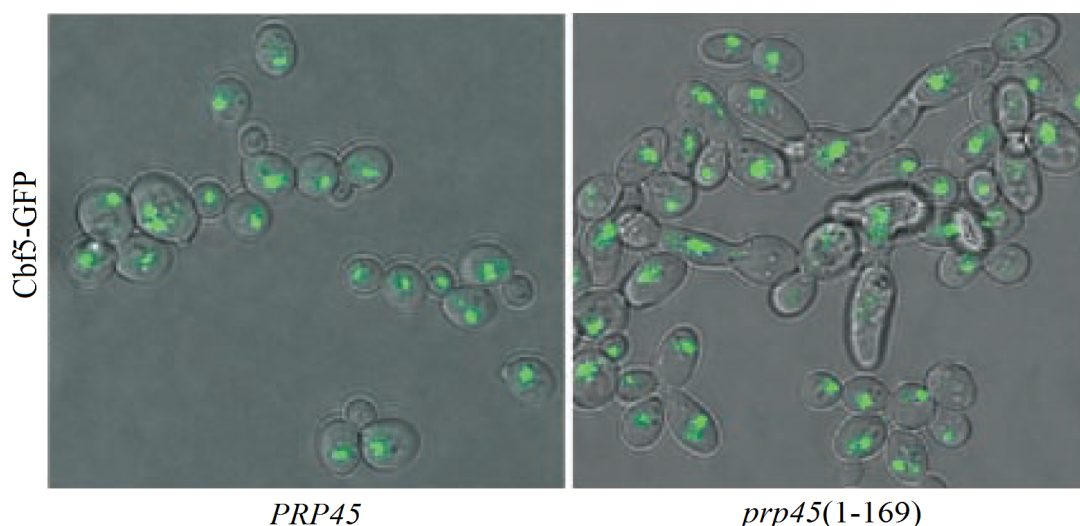
### 2.3.1.2 Prp45 a jeho role v sestřihu

Kvasinkový protein Prp45 je dlouhodobě centrem zájmu v naší laboratoři. Byla prokázána jeho role v sestřihu, snížení množství Prp45 v buňce mělo totiž za následek akumulaci pre-mRNA v buňce. Bylo také zjištěno mnoho jeho genetických a fyzických interakcí s komponentami komplexu NTC a faktory druhého kroku sestřihu. Se sestřihovými komplexy asociuje v závislosti na sestřihu, se snRNA U2, U5 a U6 pak nezávisle na sestřihu. Stejně jako jeho homolog SKIP asociuje se spliceosomem během sestřihových reakcí a po druhé katalytické reakci zůstává navázán na vystřižený intron (Albers *et al.*, 2003, Gahura *et al.*, 2009). Prokázaná fyzická interakce s dalším proteinem komplexu NTC, Prp46 (Ohi a Gould, 2002, Albers *et al.*, 2003), byla využita k získání výsledků v této práci.

Za zmínku pak stojí vztah Prp45 s proteinem Prp22, ATP-dependetní helikázou RNA. Ta se účastní uvolnění sestřižené mRNA ze spliceosomu a je důležitá pro vystřížení intronů s dlouhou vzdáleností bodu větvení a 3' sestřihového místa (Schwer a Gross, 1998, Ohi a Gould, 2002). Tyto dva proteiny spolu interagují geneticky a C-koncová část Prp45 je zřejmě částečně potřebná ke správné interakci Prp22 se spliceosomem nebo k regulaci Prp22, jak vypovídají zjištění, že množství Prp22 v purifikovaných spliceosomálních komplexech bylo poněkud sníženo při nepřítomnosti C-koncové části Prp45 (Gahura *et al.*, 2009). To by mělo zároveň implikovat fyzickou interakci Prp45 s Prp22. V kontextu s existencí genetické interakce lze tedy předpokládat, že existuje funkční spojení těchto dvou komponent spliceosomu. I jejich fyzické interakci bude věnována pozornost v této práci.

### **Zkrácená alela *prp45(1-169)***

Ke studiu vlivu Prp45 se v naší laboratoři využívá zkrácená alela *prp45(1-169)*, která exprimuje pouze 169 N-koncových aminokyselin z celkových 379. Tato alela postrádá konzervovaný motiv SWNKN. Buňky exprimující takto zkrácený protein vykazují teplotně senzitivní fenotyp - zastavují růst asi po 6 hodinách v represivní teplotě (37 °C). Při růstu v permissivní teplotě má část buněk deformovaný tvar naznačující defekty dělení (obrázek 9; Gahura *et al.*, 2009). Tato mutanta se využívá ke studiu sestřihu, ale také k hledání souvislostí s transkripcí.



Obrázek 9: Porovnání morfologie mutant obsahujících *prp45(1-169)* a buněk divokého typu. Jádra byla vizualizována prostřednictvím fúzního proteinu Cbf5-GFP (převzato z Gahura *et al.*, 2009).

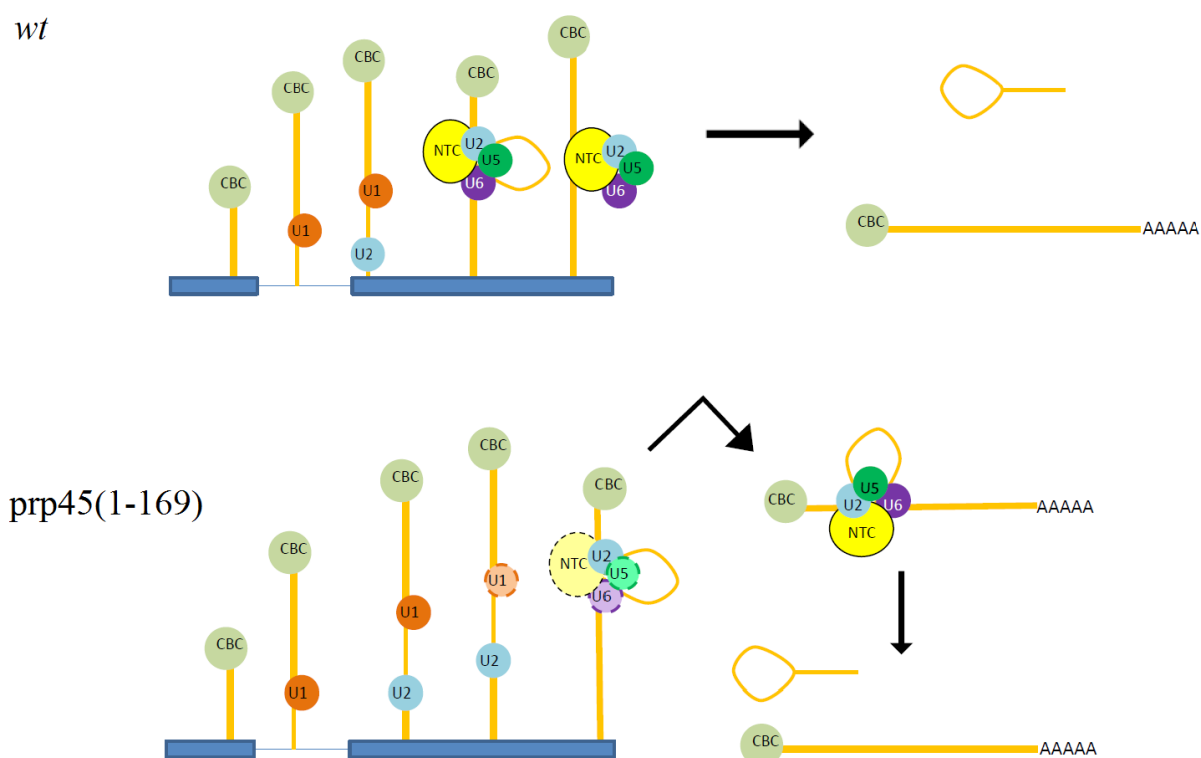
V souvislosti se sestřihem bylo díky této alele zjištěno, že v takto mutovaných buňkách je akumulována pre-mRNA (je nabohacena 2-6x), aniž by byla narušena její degradace nebo export z jádra. Hladiny mRNA sestřihovaných genů jsou však přibližně na normálních hladinách. Taktéž bylo zjištěno, že je v těchto mutantách porušeno vyvazování Prp45 na geny obsahující introny a mající dlouhý druhý exon (M. Hálová, nepublikované výsledky).

Novější výsledky chromatinových imunoprecipitací pak ukazují, že Prp45 ovlivňuje více kroků sestřihu – nepřítomnost C-konce Prp45 vedla k defektům časných stádií sestavování spliceosomu, což následně ovlivnilo i další stadia sestřihu (M. Hálová, nepublikované výsledky). Zjištění, že se Prp45 účastní nejenom druhého kroku sestřihu, ale i jeho časných fází, podporuje domněnku o komplexitě procesů, kterých se účastní po vzoru svého homologa SKIP.

### **2.3.1.3 Prp45 a transkripce**

Zatímco jeho účast v sestřihu je nepochybná, roli Prp45 v regulaci transkripce na rozdíl od SKIP dosavadní výsledky spíše jen naznačují. Například bylo pozorováno, že Prp45 přímo cílený na promotor reportérového genu byl v kvasince schopen aktivovat transkripci. Tato schopnost vyžadovala přítomnost jeho C-koncové poloviny (Martinkova *et al.*, 2001), která je i u SKIP nutná např. pro aktivaci transkripce prostřednictvím receptorů pro vitamin D (Baudino *et al.*, 1998). To tedy znamená, že Prp45 je schopen aktivovat transkripci, jestliže se vyskytne v blízkosti jejího startu. Že se skutečně v tomto místě může vyskytovat *in vivo*, pak napovídají další výsledky.

Výzkumným týmem naší laboratoře bylo zjištěno, že v buňkách s alelou *prp45(1-169)* je sestřih genů, u kterých za normálních podmínek probíhá kotranskripčně, většinou posttranskripční (obrázek 10). Chromatinovými imunoprecipitacemi s protilátkou proti epitopu na komponentě komplexu NTC, Prp19, bylo totiž zjištěno její významně snížené vyvazování na transkript během transkripce (M. Hálová, nepublikované výsledky).



Obrázek 10: Schéma kotranskripčního průběhu sestřihu u buněk divokého typu (wt; nahoře) a posttranskripčně probíhajícího sestřihu u buněk s alelou *prp45(1-169)* (dole) (M. Hálová, nepublikované výsledky).

Významným zjištěním vypovídajícím o zapojení Prp45 do jiných stádií genové exprese byly nálezy genetických interakcí Prp45 s mnoha proteiny účastnicími se remodelace chromatinu a regulace transkripce (A. Valentová, nepublikované výsledky, K. Abrahámová, nepublikované výsledky), některé interakce byly také nalezeny v dvouhybridním systému (Albers *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2008). Tyto pozorované interakce nastiňují roli Prp45 v regulaci chromatinu a transkripce. Nicméně fyzické interakce mimo sestřihový aparát nebyly zatím studovány dostatečně, míra přímého fyzického zapojení Prp45 do regulace transkripce či chromatinu tedy není zatím objasněna.

Na základě výše uvedených zjištění se nabízí hypotéza, že Prp45 reguluje sestavování spliceosomu prostřednictvím změn v chromatinových modifikacích a současně, nebo pouze, prostřednictvím změn v dynamice nukleozómů.

### 2.3.2 Vybrané regulátory stavu chromatinu

Jak bylo uvedeno výše, dle výsledků testování v dvouhybridním systému lze předpokládat, že protein Prp45, prokazatelně se účastní sestřihu, fyzicky interaguje s mnoha proteiny ovlivňujícími stav chromatinu a transkripci (Albers *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2008). S některými z nich (komplex SAGA, Eaf3) současně geneticky interagují jiné sestřihové komponenty (obrázek 3, Moehle *et al.*, 2012). Na základě těchto výsledků byly pro další analýzu vybrány následující proteiny:

**Ada2** (název je odvozen od *transcriptional adaptor*) je neesenciální protein vážící se na chromatin a je podjednotkou HAT komplexů SAGA (Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferázový komplex), SLIK (*Saga-like*) a ATAC (Ada2/Gcn5/Ada3 *transcription activator complex*), které koaktivují transkripci prostřednictvím acetylace N-koncových lysinů na histonu H2B a H3 (Marcus *et al.*, 1994, Grant *et al.*, 1997, Silverman *et al.*, 1997, Balasubramanian *et al.*, 2002, Pray-Grant *et al.*, 2002, Sterner *et al.*, 2002). Ada2 v těchto komplexech zvyšuje aktivitu katalytické podjednotky komplexu, HAT Gcn5, a zároveň je pro tuto její aktivitu esenciální (Balasubramanian *et al.*, 2002, Boyer *et al.*, 2002).

**Ngg1** (neboli Ada3) je rovněž neesenciální transkripční koaktivátor, je také podjednotkou HAT komplexů SAGA, SLIK a ATAC (Berger *et al.*, 1992, Brandl *et al.*, 1993, Saleh *et al.*, 1997, Grant *et al.*, 1998, Pray-Grant *et al.*, 2002), je též nutná pro aktivitu Gcn5 a hraje roli ve výběru lysinů podstupujících acetylaci (Balasubramanian *et al.*, 2002).

**Ahc1** (*ADA HAT complex component 1*) je podjednotkou HAT komplexu ATAC, ve kterém plní funkci zajišťování strukturní integrity (Eberharter *et al.*, 1999).

**Yta7** (*Yeast Tat-binding Analog*) reguluje genovou expresi histonů, interaguje s vyčnívajícími N-konci histonu H3 a má ATPázovou aktivitu (Schnall *et al.*, 1994, Agostoni Carbone *et al.*, 1998, Gradolatto *et al.*, 2008, Fillingham *et al.*, 2009).

**Eaf3** (*Esalp-associated factor*) je komponenta histon deacetylázového komplexu Rpd3S a současně HAT komplexu NuA4, který acetyluje histon H4 (Eisen *et al.*, 2001, Carrozza *et al.*, 2005).

**Vps75** (*Vacuolar Protein Sorting*) patří do rodiny histonových chaperonů NAP (*nucleosome assembly protein*). Váže se na histony, preferenčně na H3 a H4, a na HAT Rtt109 (která acetyluje lysin 56 na histonu H3), jejíž aktivitu stimuluje. *In vitro* byla také pozorována jeho schopnost sestavovat nukleozómy (Bonangelino *et al.*, 2002, Han *et al.*, 2007, Selth a Svejstrup, 2007, Fillingham *et al.*, 2008, Park *et al.*, 2008).

Nalezení fyzické interakce Prp45 s některým z těchto proteinů by významně přispělo k odpovědi na otázku, jaký význam má kotranskripční charakter sestřihu pro jeho regulaci a spřažení s ostatními fázemi genové exprese.



## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Kultivační média a roztoky

Média připravovat z deionizované vody a sterilizovat v autoklávu 20 min při 121 °C. Pevná média po zchladnutí nalít na Petriho misky a nechat ztuhnout.

##### 3.1.1.1 Kultivace bakterií

###### LB (Luria-Bertani) s ampicilem (tekuté)

10 g/l            Universalpepton M66

5 g/l            Yeast Extract

5 g/l            NaCl

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C:

100 mg/l        Ampicilin

###### ŽA (pevné)

40 g/l            Živný agar č. 2

###### ŽAMP (pevné)

40 g/l            Živný agar č. 2

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C:

100 mg/l        Ampicilin

##### 3.1.1.2 Kultivace kvasinek

###### YPAD (tekuté)

20 g/l            Universalpepton M66

10 g/l            Yeast Extract

100 mg/l        Adenin-hemisulfát

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C:

2 %                      Glukóza (w/v - *mass/volume*)

100 mg/l              Ampicilin

### **YPAD (pevné)**

- stejné složení jako YPAD (tekuté), přidat 15-18 g/l agaru

- v případě potřeby po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C přidat selekční antibiotikum:

200 mg/l              Geneticin

90 mg/l                Nourseothricin

### **SD (pevné)**

6,7 g/l                Yeast nitrogen base without amino acids

1,394 g/l              Synthetic complete amino acid drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura

15-18 g/l              Agar

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C:

2 %                      Glukóza (w/v)

100 mg/l              Ampicilin

- přidat aminokyseliny/báze dle auxotrofie použitých kmenů:

20 mg/l                L-Histidin HCl monohydrát

100 mg/l              L-Leucin

20 mg/l                L-Tryptofan

20 mg/l                L-Uracil

### **SD<sup>-Met/Lys/Ade</sup> (pevné)**

- stejné složení jako SD (pevné), nepřidávat Synthetic complete amino acid drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C přidat další aminokyseliny/báze dle auxotrofie použitých kmenů:

30 mg/l                L-lysine

20 mg/l                L-methionine

100 mg/l              Adenin (Adenin-hemisulfát)

### Presporulační agar

20 g/l Universalpepton M66

10 g/l Yeast Extract

20 g/l Agar

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C:

10 % Glukóza (w/v)

100 mg/l Ampicilin

### Sporulační agar

5 g/l KAc

2,3 g/l KCl

20 g/l Agar

- po sterilizaci a vychladnutí na 50 °C:

100 mg/l Ampicilin

- volitelně přidat aminokyseliny/báze dle auxotrofie použitých kmenů (viz SD médium)

### Ringerův roztok

7,5 g/l NaCl

0,075 g/l Kcl

0,1 g/l NaHCO<sub>3</sub>

0,1 g/l CaCl<sub>2</sub>

## 3.1.2 Přehled použitých kvasinkových a bakteriálních kmenů

### *Escherichia coli*

kmen	genotyp	zdroj
DH5α	$\phi 80dlacZ\Delta M15$ <i>recA gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ( $r_K^-$ , $m_K^+$ ) <i>supE44 relA1 deoR</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U169	Meselson a Yuan, 1968

### *Saccharomyces cerevisiae*

kmen	genotyp	zdroj/vznik
BY4741	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995

<b>kmen</b>	<b>genotyp</b>	<b>zdroj/vznik</b>
BY4742	MAT $\alpha$ <i>his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
AVY18	MAT $\alpha$ <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	integrace do BY4742
AVY73	MAT $\alpha$ <i>PRP45-3HA::NatMX6 his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	integrace do BY4742
PRP46-GFP	MAT $\alpha$ <i>PRP46-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
PRP22-GFP	MAT $\alpha$ <i>PRP22-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
ADA2-GFP	MAT $\alpha$ <i>ADA2-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
AHC1-GFP	MAT $\alpha$ <i>AHC1-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
YTA7-GFP	MAT $\alpha$ <i>YTA7-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
NGG1-GFP	MAT $\alpha$ <i>NGG1-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
EAF3-GFP	MAT $\alpha$ <i>EAF3-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
VPS75-GFP	MAT $\alpha$ <i>VPS75-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
SKI3-GFP	MAT $\alpha$ <i>SKI3-GFP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Huh <i>et al.</i> , 2003
PRP46-TAP	MAT $\alpha$ <i>PRP46-TAP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Howson <i>et al.</i> , 2005
ADA2-TAP	MAT $\alpha$ <i>ADA2-TAP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Howson <i>et al.</i> , 2005
AHC1-TAP	MAT $\alpha$ <i>AHC1-TAP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Howson <i>et al.</i> , 2005
YTA7-TAP	MAT $\alpha$ <i>YTA7-TAP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Howson <i>et al.</i> , 2005
NGG1-TAP	MAT $\alpha$ <i>NGG1-TAP::His3MX his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>	Howson <i>et al.</i> , 2005
EGY48	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1 LexA<sub>op(x6)</sub>-LEU2</i>	Gyuris <i>et al.</i> , 1993
KAY08	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1 LexA<sub>op(x6)</sub>-LEU2 prp45(1-177)-3HA::KanMX6</i>	integrace do EGY48

kmen	genotyp	zdroj/vznik
KAY09	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1</i> LexA <sub>op(x6)</sub> - <i>LEU2</i> <i>prp45(1-162)-3HA::KanMX6</i>	integrace do EGY48
KAY10	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1</i> LexA <sub>op(x6)</sub> - <i>LEU2</i> <i>prp45(1-151)-3HA::KanMX6</i>	integrace do EGY48
KAY11	MAT $\alpha$ <i>ura3 his3 trp1</i> LexA <sub>op(x6)</sub> - <i>LEU2</i> <i>prp45(1-131)-3HA::KanMX6</i>	integrace do EGY48

### 3.1.3 Přehled použitých primerů

název	sekvence	směr	oblast nasedání
AV15	ACTAAAGCTGAATCCGATGATAAATCGGATAA CTATGGCGCCCGGATCCCCGGGTAAATTAA	přímý	5' konec kazety GST- <i>NatMX6</i> *
AV17	TGGTCAATAAGAGCGACCTC	zpětný	kazeta <i>NatMX6</i>
AV18	ACAGCCACCATATTGAGGTAG	přímý	střed <i>PRP45</i>
AV60	GATAGATTGTGCGCACCTG	zpětný	kazeta <i>KanMX6</i>
EH06	CGAGACTCACAGGTAGGTTA	přímý	<i>PRP22</i>
EH07	GATCTGGGTATCTTGAGAAGC	zpětný	<i>GFP</i>
FP01	GCCGAATTCAACTCAAGCACAAGAATG	zpětný	3' UTR <i>PRP45</i>
KM03	GCCGAATTCATGGGAGCAATAGTTAAGC	přímý	3' konec <i>PRP45</i>
KM10	CAAGCACAAGAATGCTTTGTTTTCCTAGTGCT CATCCTGGGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	zpětný	3' konec <i>TEF</i> terminátoru*

\*komplementární je pouze podtržená část

### 3.1.4 Přehled použitých enzymů

enzym	název	katalogové číslo	koncentrace	výrobce
DNA polymeráza	Taq DNA Polymerase, recombinant	EP0403	1 U/ $\mu$ l	Fermentas
benzonáza	Benzonase <sup>®</sup> Nuclease	70746-3	25 U/ $\mu$ l	Novagen
MNáza	Micrococcal Nuclease	EN0181	300 U/ $\mu$ l	Fermentas
RNáza A	RNase A, DNase and protease-free	EN0531	10 mg/ml	Fermentas
Yeast Lytic Enzyme	Quantazyme ylg <sup>™</sup>	QUA0201	20 U/ $\mu$ l*	Qbiogene

\* po rozpuštění ve vodě dle návodu výrobce

**Restrikční endonukleázy (10 U/μl; Fermentas)**

<b>název</b>	<b>místo štěpení</b>	<b>katalogové číslo</b>
BamHI	G/GATCC	ER0051
EcoRI	G/AATTC	ER0271
HindIII	A/AGCTT	ER0501
NcoI	C/CATGG	ER0571
NdeI	CA/TATG	ER0581
NheI	G/CTAGC	ER0971
NotI	GC/GGCCGC	ER0591
SmaI	CCC/GGG	ER0661
XhoI	C/TCGAG	ER0691

**3.1.5 Přehled použitých protilátek****Primární protilátky**

<b>název, specifita</b>	<b>organismus</b>	<b>klonalita</b>	<b>výrobce</b>	<b>použité ředění*</b>
anti-HA.11 Clone 16B12 antibody; <i>MMS-101P</i>	myš	mono	Covance	1:1000
Anti-HA tag antibody [HA-7] (Alkaline Phosphatase); <i>ab49745</i>	myš	mono	Abcam	1:4000
Anti-GFP antibody (Alkaline Phosphatase); <i>ab6661</i>	koza	poly	Abcam	1:1000
Anti-Glutathione-S-Transferase (GST) antibody; <i>G7781</i>	králík	poly	Sigma	1:2000
anti-TAP tag antibody; <i>CAB001</i>	králík	poly	Pierce	1:1000

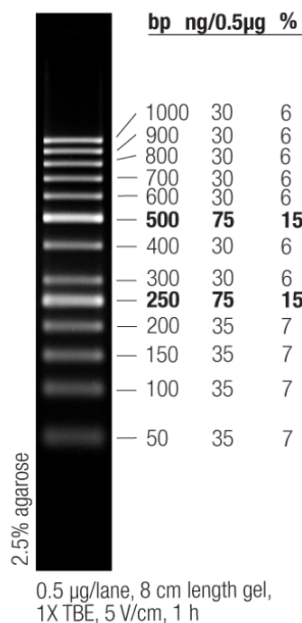
\*pro imunodetekci

**Sekundární protilátky**

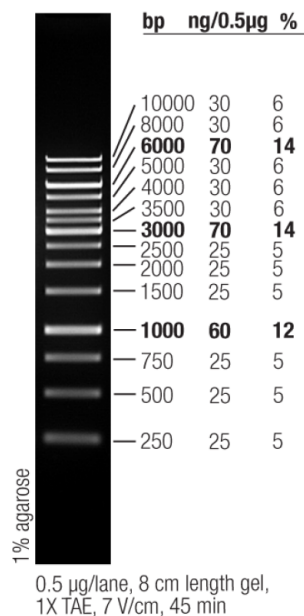
<b>název</b>	<b>specifita</b>	<b>organismus</b>	<b>výrobce</b>	<b>použité ředění*</b>
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) AP Conjugate, <i>170-6520</i>	myší protilátka	koza	Bio-Rad	1:3000
Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) AP Conjugate, <i>170-6518</i>	králičí protilátka	koza	Bio-Rad	1:2000 - 1:3000

\*pro imunodetekci

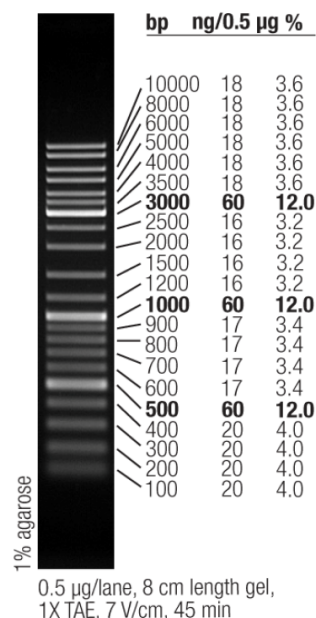
### 3.1.6 Standardy velikostí a množství DNA fragmentů a proteinů



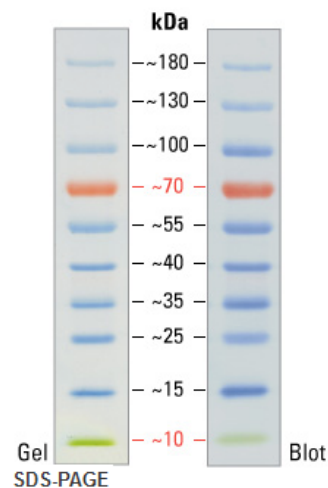
Obrázek 11: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, (SM0371, Fermentas)



Obrázek 12: GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311, Fermentas)



Obrázek 13: GeneRuler DNA Ladder Mix, (SM0331, Fermentas)



Obrázek 14: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (26616, Fermentas)

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Kultivace mikroorganismů

#### Růst na pevných médiích

Na Petriho misky s pevným kultivačním médiem (viz kapitola 3.1.1) sterilně nanést skleněnou tyčinkou pevnou biomasu nebo skleněnou zahnutou tyčinkou rozetřít tekutou kulturu. Misky s kvasinkou *S. cerevisiae* uchovávat ve 30 °C, růst trvá 3-4 dny, misky s bakterií *E. coli* uchovávat ve 37 °C, růst trvá 1 den.

Misky s narostlými buňkami lze uchovávat po dobu až třech týdnů v 5 °C, buňky lze pasážovat cca dva měsíce.

#### Růst v třepaných médiích

Do Erlenmayerových baněk naplněných maximálně do 1/10 celkového objemu tekutým kultivačním médiem (viz kapitola 3.1.1) sterilně přenést mikrobiologickou kličkou malé množství biomasy a inkubovat na třepačce při 180 rpm (otáčky za minutu) ve 30 °C (*S. cerevisiae*) resp. 37 °C (*E. coli*).

Nárůst kultury sledovat fotometricky na spektrofotometru.

### 3.2.2 Příprava a výsev glycerolových konzervovaných kvasinkových kultur

Kvasinkové kmeny je nutné dlouhodobě uchovávat v -80 °C.

Při přípravě konzervovaných kultur k suspenzi čerstvých buněk v deionizované vodě sterilně přidat v poměru 1:1 60% (w/v) pufovaný glycerol a promíchat. Inkubovat za občasného promíchání 20 minut v 5 °C, poté uložit do -80 °C.

Při výsevu zmrazených kultur seškrábnout sterilním párátkem vrchní vrstvu buněk a nanést na misku s pevným médiem. Pracovat rychle, aby nedošlo k rozmrazení kultur.



### 3.2.3 Křížení a sporulace kvasinkových kmenů

#### Křížení

Suspenze haploidních kmenů *S. cerevisiae* opačných párovacích typů (MATa a MATα) v deionizované vodě (cca 30-50 µl) kápnout přes sebe na pevné médium YPAD a inkubovat minimálně 4 hodiny při teplotě 30 °C. Křížené buňky přenést na vhodné pevné selekční médium, které umožňuje růst pouze diploidním buňkám, a inkubovat několik dní při teplotě 30 °C.

#### Sporulace

Buňky příslušného diploidního kmene *S. cerevisiae* hustě nanést na misku s presporulačním agarem a inkubovat při 30 °C do druhého dne. Narostlou biomasu kvantitativně přenést do mikrozkuhavky a resuspendovat ve vodě, usadit centrifugací a pelet resuspendovat v takovém objemu Ringerova roztoku, aby vznikla hustá suspenze. Suspenzi kápnout na misku se sporulačním agarem a nechat zaschnout. Do víčka misky vložit čtvereček navlhčené buničité vaty, misky inkubovat dnem nahoru 4-6 dní při pokojové teplotě. Průběžně mikroskopicky kontrolovat množství vzniklých tetrad.

### 3.2.4 Mikromanipulace kvasinkových tetrad po sporulaci, tetradová analýza

Malé množství dostatečně vysporulovaných buněk resuspendovat v 50 µl roztoku *Yeast Lytic Enzyme* (1 mg/ml). Vřecka nechat enzymaticky opracovat 5-10 min v laboratorní teplotě, kvalitu natrávení kontrolovat mikroskopicky. Dostatečně natrávená vřecka naředit 1 ml deionizované vody.

Na jeden kraj misky s rovným pevným médiem YPAD nanést asi 20 µl suspenze, rozetřít skleněnou zahnutou tyčinkou podél tohoto kraje do vymezeného úseku. Po zaschnutí přebytečné vody oddělit spory z vřecek pomocí mikromanipulátoru. Spory nechat klíčit asi 4 dny ve 30 °C, vzniklé monokolonie dále přenést na různá selekční média pro určení genotypu vzniklých kmenů.

### 3.2.5 Transformace bakterií elektroporací

#### Příprava kompetentních buněk

Pracovat v ledové lázni. 400 ml kultury *E. coli* DH5 $\alpha$  (viz kapitola 3.1.2) třepané v LB médiu (37 °C, 180 rpm) v exponenciální fázi růstu (OD<sub>595</sub> – optická denzita při 595 nm ~ 0,6) ochladit 10 až 15 minut v ledové lázni, následně usadit buňky centrifugací (3500 g, 4 °C, 10 min). Sediment resuspendovat v původním objemu vychlazené deionizované vody a znovu centrifugovat, resuspendovat v polovičním objemu vody a opět centrifugovat, resuspendovat v malém množství 10% (w/w - *mass/mass*) vychlazeného glycerolu a glycerolem doplnit na 1/4 původního objemu. Centrifugovat (2800 g, 4 °C, 20 min) a resuspendovat v jednom objemu 10% glycerolu.

Pro dlouhodobé skladování kompetentních buněk rozdělit výslednou suspenzi po 100-200  $\mu$ l do 1,5ml mikrozkušavek předem vychlazených v tekutém dusíku, ihned zamrazit v tekutém dusíku, skladovat v mrazáku v -80 °C.

#### Vlastní transformace plazmidové DNA

Pracovat v ledové lázni až do aplikace elektrického pulzu. K 50  $\mu$ l rozmrzlých elektrokompetentních buněk (viz výše) přidat 0,5-5  $\mu$ l roztoku plazmidové DNA v deionizované vodě (obsahujícího 5 pg - 0,5  $\mu$ g DNA). Obsah mikrozkušavky převést do vychlazené elektroporační kyvety se vzdáleností elektrod 2 mm. Suchou kyvetu vložit do přístroje *Gene Pulser Apparatus* (generátor pulzu) a aplikovat pulz za nastavených hodnot kapacitance 25  $\mu$ F, napětí 2,5 kV a odporu 200  $\Omega$ , pulz trvá cca 4-5 ms. Po aplikaci pulzu obsah kyvety ihned resuspendovat v 1 ml LB média s 20 mM glukózou (5 g/l) a převést do skleněné 10ml zkumavky. Následně inkubovat na třepačce (37 °C, 180 rpm, 60 min).

Na plotny s médiem ŽAMP (obsahuje selekční antibiotikum ampicilin, 100  $\mu$ g/ml, viz kapitola 3.1.1.1) vysít 20, 100 a 250  $\mu$ l kultury, plotny inkubovat ve 37 °C přes noc. Předpokládaný výtěžek je asi 10<sup>5</sup> transformovaných buněk na 1 ng intaktního, čerstvě izolovaného plasmidu.

### 3.2.6 Transformace bakterií v TSS

(Upraveno podle Chung et al., 1989)

#### Příprava kompetentních buněk

Kulturu bakterií *E. coli* DH $\alpha$  v exponenciální fázi růstu naředit do 100 ml tekutého LB média na OD<sub>595</sub> ~ 0,15 a nechat růst na OD<sub>595</sub> ~ 0,3-0,4, poté ochladit na ledu a centrifugovat (1000 g, 10 min, 4 °C), pelet resuspendovat v 10 ml roztoku TSS (*transformation and storage solution*).

Pro dlouhodobé skladování kompetentních buněk rozdělit výslednou suspenzi po 600  $\mu$ l do 1,5ml mikrozkušavek vychlazených v tekutém dusíku, ihned zamrazit v tekutém dusíku, skladovat v mrazáku v -80 °C.

#### Vlastní transformace plazmidové DNA

100  $\mu$ l suspenze buněk v roztoku TSS přenést do vychlazené mikrozkušavky, smíchat s plazmidovou DNA (cca 100 pg) a inkubovat 30 min ve 4 °C. Následně přidat 0,9 ml LB média s 20 mM glukózou a nebo roztoku TSS, přenést do skleněné 10ml zkumavky a inkubovat na třepačce (37 °C, 180 rpm, 60 min) pro umožnění exprese transformované DNA.

Vysévat na plotny s ŽAMP médiem jako v kapitole 3.2.5.

#### Použité roztoky:

- TSS = LB médium (viz kapitola 3.1.1.1) obohacené o:

10% (w/v) PEG (polyethylenglykol), 5% (v/v - *volume/volume*) DMSO (dimethylsulfoxid), 50 mM MgCl<sub>2</sub>

Upravit pH na 6,5, sterilizovat filtrací, vždy připravovat čerstvě.

### 3.2.7 Izolace plasmidů z bakterií alkalickou metodou

Bakteriální kmen *E. coli* nesoucí příslušný plazmid (s rezistencí k ampicilinu) nanést na médium ŽAMP pro nárůst monoklonií a kultivovat přes noc při 37 °C.

Jednu dobře oddělenou kolonii přenést do 30 ml LB média s ampicilinem a inkubovat na třepačce přes noc (37 °C, 180 rpm).

Narostlou kulturu ochladit cca 10 min v ledové lázni a centrifugovat (2500 g, 20 min, 4 °C). Sediment resuspendovat v 1 objemu (cca 2 ml) vychlazeného roztoku I. Mimo ledovou lázeň přidat k suspenzi 2 objemy (peletu; cca 4 ml) nechlazeného roztoku II, promíchat otáčením zkumavky, nechat lyzovat 1-10 minut při laboratorní teplotě. Lyzát vrátit do ledové lázně a přidat 1,5 objemu (peletu; cca 3 ml) vychlazeného roztoku III, promíchat otáčením zkumavky a inkubovat alespoň 15 minut na ledu pro vysrážení proteinů. Sraženinu usadit centrifugací (22000 g, 20 min, 4 °C), získaný supernatant dokonale smísit důkladným protřepáním zkumavky s 0,6 objemu vychlazeného izopropanolu a ihned centrifugovat (2500 g, 5 min, 4 °C).

Supernatant důkladně odstranit a sediment krátce nechat ve zkumavce oschnout, poté rozpustit v 300 µl deionizované vody a dokonale smíchat se stejným objemem 10 M LiCl. Následně inkubovat 10 min v -80 °C nebo 30-60 min v -20 °C, čímž se vysráží zbytek proteinů. Vzniklou sraženinu usadit centrifugací (16000 g, 5 min), supernatant smísit s jedním objemem 96% ethanolu a opět inkubovat 10 min v -80 °C nebo 30-60 min v -20 °C. Vysráženou plazmidovou DNA usadit centrifugací (16000 g, 5 min), supernatant odstranit a sraženinu opláchnout 1 ml 70% ethanolu. Znovu centrifugovat a odstranit supernatant. Sediment nechat několik minut oschnout (odstranění zbytkového ethanolu) a rozpustit ve 100 µl deionizované vody nebo TE pufru (pH 8,0). Množství a kvalitu vyizolované DNA je možné ověřit elektroforetickou analýzou.

#### **Použité roztoky:**

- **Roztok I :** 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA-NaOH, 1% (w/v) glukóza; pH 8,0
- **Roztok II :** 1% (w/v) SDS (sodiumdodecylsulfát), 0,2 M NaOH
- **Roztok III:** 3 M octan draselný, 2 M kyselina octová; pH 5,4
- **10x TE pufr:** 0,1 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA
  - pH upravit pomocí HCl na požadovanou hodnotu

### **3.2.8 Izolace plasmidů z bakterií pomocí sady NucleoSpin®**

#### **Plasmid**

5 ml kultury *E. coli* obsahující daný plasmid narostlé v LB médiu s ampicilinem převést do centrifugační zkumavky a centrifugovat (11000 g, 30 s), odstranit supernatant.

Pelet důkladně resuspendovat v 250  $\mu$ l roztoku A1. Přidat 250  $\mu$ l roztoku A2 a opatrně promíchat otáčením zkumavky. Inkubovat při laboratorní teplotě maximálně 5 minut. Přidat 300  $\mu$ l roztoku A3 a promíchat otáčením zkumavky. Lyzát centrifugovat (11000 g, 5 min), supernatant musí být čirý.

Kolonku NucleoSpin® Plasmid umístit do 2ml mikrozukavky, nanést supernatant a centrifugovat (11000 g, 1 min), odstranit tekutinu ze sběrné mikrozukavky („*flow through*“) a vrátit kolonku do mikrozukavky.

Pro zbavení se buněčných nukleáz je doporučeno nanést na kolonku 500  $\mu$ l roztoku AW předeřátého na 50 °C a opakovat centrifugaci.

Na kolonku nanést 600  $\mu$ l roztoku A4 (obsahujícího ethanol) a opět centrifugovat. Znovu odstranit tekutinu ze sběrné mikrozukavky a vrátit kolonku do mikrozukavky. Centrifugovat (11000 g, 2 min) pro odstranění zbytků ethanolu.

Kolonku umístit do čisté 1,5 ml mikrozukavky, eluovat DNA přidáním 50  $\mu$ l roztoku AE, inkubovat 1 min při pokojové teplotě a poté centrifugovat (11000 g, 1 min).

### 3.2.9 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou

#### Příprava kompetentních buněk

Kulturu příslušného kmene *S. cerevisiae* narostlou přes noc ve vhodném tekutém médiu naředit do 10-25 ml stejného tekutého média na  $OD_{595} \sim 0,1$  ( $2-5 \times 10^6$  buněk/ml). Kultivovat na třepačce (30 °C, 180 rpm) po dobu dvou generací resp. do dosažení  $OD_{595} \sim 0,4-0,5$  (tj.  $1-2,5 \times 10^7$  buněk/ml).

Na jednu transformaci odebrat takové množství kultury, které obsahuje cca  $10^8$  buněk (tj. 4 ml při  $OD_{595} = 0,5$ ), a centrifugovat (1400 g, 3 min, 20 °C). Odstranit supernatant, buňky promýt v jednom objemu (původní kultury) deionizované vody a opět centrifugovat (1400 g, 3 min, 20 °C). Odstranit supernatant, sediment resuspendovat v 1ml deionizované vody, přenést do 1,5ml mikrozukavky a centrifugovat (16 000 g, 30 s, 20 °C). Supernatant odstranit.

#### Vlastní transformace

Do 1,5ml mikrozukavky připravit transformační směs:

73  $\mu$ l deionizované vody

36  $\mu$ l 1 M LiAc

10 µl *salmon sperm* DNA (10 mg/ml) čerstvě denaturované povařením  
1 µl plasmidové DNA (0,1-1 µg)  
240 µl 50% (w/v) PEG

Transformační směs důkladně promíchat, resuspendovat v ní buněčný pelet a inkubovat ve 42 °C 40 min (nebo až 3 h pro vyšší efektivitu transformace), během inkubace směs občas promíchat převrácením zkumavky.

Centrifugovat (16 000 g, 30 s, 20 °C), dokonale odstranit supernatant a resuspendovat v 300 µl deionizované vody.

Transformované buňky vysít po 50 µl a 100 µl na plotny s příslušným selekčním médiem a inkubovat 3-4 dny při 30 °C.

### 3.2.10 Izolace chromozomální DNA z kvasinek

Kvasinkovou kulturu ve stacionární fázi růstu ( $OD_{595} \sim 3$ ) ve vhodném tekutém médiu usadit centrifugací (1400 g, 3 min, 20 °C), odstranit supernatant, sediment resuspendovat v 0,5 ml deionizované vody a převést do mikrozkušavky se šroubovacím víčkem.

Znovu krátce centrifugovat (16000 g, 5 s, 20 °C), supernatant odstranit, sediment resuspendovat ve zbývající tekutině.

K suspenzi na ledové lázni přidat 200 µl *yeast lysis* pufru, 200 µl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol a 300 mg skleněných kuliček. Třepáním intenzivně rozbíjet šestkrát po dobu 30 s, mezi rozbíjením vždy chladit 30 s na ledu.

Přidat 200 µl TE pufru (pH 8,0) a centrifugovat (20000 g, 10 min, 4 °C). Horní vodnou fázi převést do nové mikrozkušavky.

Přidat 1 ml chlazeného 96% ethanolu, promíchat opatrně překlápěním zkumavky, centrifugovat (20000 g, 5 min, 4 °C).

Supernatant odstranit, sediment resuspendovat ve 400 µl TE pufru, přidat 3 µl RNázy A (10 mg/ml), inkubovat 5 min při 37 °C.

Přidat 10 µl 4 M  $NH_4Ac$  a 1 ml chlazeného 96% ethanolu. Promíchat překlápěním zkumavky, inkubovat 1 hod v -20 °C nebo 30 min v -80 °C. Po skončení inkubace centrifugovat (20000 g, 5 min, 4 °C). Sediment 2x promýt vychlazeným 70% ethanolom a resuspendovat v 50 µl deionizované vody.

Kvalitu izolace lze zjistit elektroforeticky a pomocí spektrometru.

**Použité roztoky:**

- **Yeast lysis pufr:** 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA
- **Fenol:chloroform:izoamylalkohol** - smíchat v poměru 25:24:1, směs převrstvit vodou, skladovat v -20 °C
- **TE pufr** – viz 3.2.7

### 3.2.11 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Do 0,5 ml mikrozkušavky připravit restrikční směs o celkovém objemu 20 µl:

deionizovaná voda

2 µl restrikčního pufru

1-5 µl roztoku DNA ve vodě (0,01-4 µg DNA)

0,5 µl restrikčního enzymu (1-10 U enzymu/ µg DNA)

Do směsi je možné přidat více enzymů, enzym s nižší účinností lze nabohatit, množství restrikčního pufru lze také měnit (dle doporučení výrobce).

Restrikční pufr a podmínky štěpení zvolit dle doporučení výrobce pro danou restrikční endonukleázu, v případě použití kombinace dvou endonukleáz s rozdílným doporučeným pufrům a podmínkami zjistit vhodné podmínky použitím webového nástroje *Double Digest* na stránkách výrobce těchto enzymů.

Pokud následuje izolace štěpených fragmentů z gelu, navýšit všechny složky směsi tak, aby celkový objem restrikční směsi byl 50 µl.

Inkubovat 1 - 4 hodiny při optimální teplotě štěpení (nejčastěji 37 °C), poté reakci zastavit dle doporučení výrobce (nejčastěji zmrazením směsi na -20 °C nebo zahřátím na 65 °C 20 min). Naštěpenou DNA následně analyzovat elektroforeticky.

### 3.2.12 Navrhování primerů

Primery pro následnou PCR (polymerázová řetězová reakce) generovat ze zadané sekvence pomocí webového nástroje *PrimerQuest* (na [eu.idtdna.com](http://eu.idtdna.com)) podle zadaných kritérií – délka primerů,  $t_m$  (*melting temperature*) primerů, velikost produktu, maximální délka

komplementárního úseku při tvorbě homodimeru (na 3' konci primeru se obvykle tolerují 3 komplementární nukleotidy, v ostatních částech primeru maximálně 4-5 nukleotidů).

Z nabízené sady vygenerovaných primerů potom vybrat dva (přímý a zpětný), ty zkontrolovat, zda jsou např. dostatečně komplexní (každý nukleotid zastoupen alespoň třikrát), zda neobsahují na 3' konci příliš mnoho CG párů apod., a dále analyzovat ve webovém programu *OligoAnalyzer* (na stejných stránkách). V něm zkontrolovat, zda primery netvoří vlásenky v příliš vysokých teplotách, zda se sami k sobě při tvorbě homodimeru neváží příliš silně, a zda se neváží příliš silně k sobě navzájem.

Specificitu primeru zkontrolovat prohledáním DNA vstupující do reakce webovým nástrojem *BLAST*.

Primery dlouhodobě skladovat naředěné na 100  $\mu\text{M}$  roztok v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , krátkodobě jako 10  $\mu\text{M}$  roztok v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.13 Amplifikace DNA pomocí PCR

Při každé PCR připravit vedle vlastních vzorků vždy navíc vzorek bez přidané DNA pro vyloučení případné kontaminace.

Do mikrozkušavky namíchat na ledu směs pro PCR do celkového objemu 10-100  $\mu\text{l}$ :

	voda
1x	reakční pufr
1,5 mM	$\text{MgCl}_2$
250 $\mu\text{M}$ (každý)	deoxynukleotidtrifosfáty
1 $\mu\text{M}$	přímý primer
1 $\mu\text{M}$	zpětný primer
cca 10 ng	templátová DNA
0,5 $\mu\text{l}$ /100 $\mu\text{l}$	Taq polymeráza (více viz kapitola 3.1.4)

Směs promíchat a inkubovat v termocykléru podle příslušného programu navrženého pro konkrétní experiment. Po dokončení programu analyzovat amplifikovaný úsek elektroforeticky.



## Colony PCR

Z čerstvé kultury *S. cerevisiae* na pevném médiu odebrat jednu menší kolonii a resuspendovat v malém množství deionizované vody ( $\frac{1}{2}$  výsledného objemu reakce). Pro vyšší výtěžek je možné tuto suspenzi zamrazit na 10 min do  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro uvolnění DNA z buněk suspenzi povařit 5 min v  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté ihned ochladit na ledu a přidat zbylé složky směsi pro PCR (viz výše), inkubovat v termocykléru podle zvoleného programu.

### 3.2.14 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu pomocí NucleoSpin® Extract II

Čistým skalpelem co nejpresněji vyříznout oblast gelu s požadovaným fragmentem DNA, přenést jej do mikrozkušavky a zvážit. Maximální množství agarózového gelu ( $\leq 2\%$ ) na jednu extrakci je 400 mg (nebo 200 mg v případě  $> 2\%$  agarózy).

Na každých 100 mg agarózového gelu ( $\leq 2\%$ ) přidat 200  $\mu\text{l}$  roztoku NT (nebo 400  $\mu\text{l}$  roztoku NT na každých 100 mg  $> 2\%$  agarózy).

Inkubovat vzorek v  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  5–10 min, dokud se agarózový gel dokonale nerozpustí. Vzorek promíchávat každé 2 až 3 minuty.

Kolonku NucleoSpin® Extract umístit do 2ml mikrozkušavky, nanést vzorek a centrifugovat (11000 g, 1 min), odstranit roztok ze sběrné mikrozkušavky.

Přidat 600  $\mu\text{l}$  roztoku NT3 a opět centrifugovat (11000 g, 1 min), odstranit roztok ze sběrné mikrozkušavky. Pro kvantitativní odstranění roztoku NT3 (zbavení se zbytků ethanolu) znovu centrifugovat (11000 g, 2 min) a odstranit sběrnou mikrozkušavku.

Kolonku umístit do čisté mikrozkušavky, nanést 15–50  $\mu\text{l}$  elučního pufru NE (pro vyšší výtěžek větších fragmentů DNA může být předehřátý na  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), inkubovat 1 min v laboratorní teplotě a poté centrifugovat (11000 g, 1 min).

### 3.2.15 Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

Agarózový gel připravit z pufru 1x TAE, v něm rozpustit agarózu (obvykle 0,8–1,5%, dle velikosti analyzovaných fragmentů DNA), směs důkladně rozehřát tak, aby se rozpustil všechnen prášek a roztok byl čirý, po rozpuštění doplnit vypařené množství vodou do původního objemu. Nechat vychladnout na  $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$  a nalít 3–5mm vrstvu roztoku

do vnitřní elektroforézové vaničky utěsněné ze stran. Do roztoku ponořit hřebínek dle požadované velikosti jamek. Asi po 20 min vyjmout hřebínek a utěsnění na stranách vaničky a vložit ztuhlý gel ve vnitřní vaničce do vnější elektroforézové vaničky a zalít pufrům 1x TAE.

Ke vzorkům (5-50  $\mu$ l) přidat 1/6 (v případě následné extrakce DNA z gelu 1/10) objemu vzorkového pufru a tuto směs nanést do jamek. Do každé řady jamek nanést alespoň jednou 3-10  $\mu$ l standardu velikostí fragmentů (viz kapitola 3.1.6). Aparaturu napojit na zdroj napětí a dělit fragmenty DNA při napětí 3-10 V/cm.

Po dokončení dělení fragmentů barvit gel 10 – 15 min v roztoku ethidium bromidu (0,5  $\mu$ g/ml). Přebývajícím ethidium bromid odmyt v destilované vodě. Gel fotografovat v procházejícím ultrafialovém záření fotoaparátem s filtrem proti ultrafialovému záření.

#### **Použité roztoky:**

- **1x TAE:** 40 mM Tris, 20 mM ledová kyselina octová, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,5
- **6x vzorkový pufr** (*Loading dye*): 0,03% bromfenolová modř, 0,03% xylen cyanol FF, 60% (w/v) glycerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH 7,6

### **3.2.16 Měření koncentrace DNA na spektrometru**

Koncentraci DNA (či RNA) měřit na spektrofotometru určeném pro měření malých objemů (cca 2  $\mu$ l). Jako blank použít roztok, ve kterém je nukleová kyselina rozpuštěna (mpH<sub>2</sub>O, TE pufr). Přístroj by se měl zkalibrovat pomocí blanku každých pět měření.

Pokud vzorek není znečištěn proteiny, poměr jeho absorpčních maxim při 260 a při 280 nm by měl být v rozmezí  $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,2$ , přičemž hodnoty bližší 1,8 značí přítomnost DNA, hodnoty blíže 2,2 pak RNA.

Pokud vzorek není znečištěn organickými látkami (karbohydráty, peptidy, aromatické sloučeniny apod.), poměr jeho absorpčních maxim při 260 a při 230 nm by měl být  $A_{260}/A_{230} > 1,8$ .

### 3.2.17 Příprava proteinových extraktů z kvasinek

Kvasinkovou kulturu narostlou přes noc v 5 ml tekutého YPAD média naředit do 15 ml čerstvého media na  $OD_{595} \sim 0,15$  a kultivovat na třepačce (180 rpm, 30 °C) do dosažení  $OD_{595} \sim 0,4 - 1$ .

Změřit  $OD_{595}$  narostlé kultury, vypočítat, jaký objem kultury odpovídá množství buněk, které by v 1 ml média mělo  $OD_{595} \sim 3$ , tento objem odebrat do zkumavek a centrifugovat (1000 g, 3 min, 23 °C).

Supernatant odstranit, sediment resuspendovat v 1 ml deionizované vody, suspenzi převést do mikrozkušavek s bílým šroubovacím víčkem a opět centrifugovat (16000 g, 30 s, 23 °C). Supernatant odstranit a buňky mrazit 10–15 min v -20 °C, aby popraskaly. Dlouhodobě lze skladovat při -80 °C.

Následující kroky provádět v ledové lázni, aby nedošlo ke znehodnocení vzorku proteázami.

Čerstvě připravit v ledové lázni roztok 1,85 M NaOH a 7% (v/v)  $\beta$ -mercaptoethanolu (redukční činidlo), 100  $\mu$ l roztoku přidat k suspenzi buněk. Třepáním buňky rozbít čtyřikrát 30 s, mezi rozbíjením chladit vždy 30 s v ledové lázni. Poté inkubovat 10 min v ledové lázni.

K suspenzi pro vysrážení proteinů přidat 100  $\mu$ l 50% (w/v) kyseliny trichloroctové, inkubovat 5 min v ledové lázni, poté centrifugovat (13500 g, 10 min, 0 °C).

Supernatant odstranit, pro neutralizaci proteinů přidat k sedimentu 500  $\mu$ l nepufrovaného 1 M Tris, sediment lehce resuspendovat a ihned znovu centrifugovat.

Supernatant důkladně odstranit, sediment resuspendovat ve 100  $\mu$ l nahřátého 2x Laemmliho pufru, skladovat v -80 °C.

Před nanášením na akrylamidový gel přidat 1/20 objemu 1 M DTT (dithiothreitol), suspenzi inkubovat 5 min v 95 °C nebo 10-15 min v 80 °C.

#### Použité roztoky:

- **2x Laemmliho puf:** 0,112 M Tris-HCl, pH 6,8, 3,42% (w/v) SDS, 12% (v/v) glycerol, 0,002% bromfenolová modř

### 3.2.18 Příprava proteinových extraktů z kvasinek pro precipitaci

(Upraveno dle Keogh Lab Protocols, viz <https://sites.google.com/site/mckeogh2/protocols> – Whole Cell Extracts (II), suitable for IPs; a dle Garcia et al., 2012)

Kulturu příslušného kvasinkového kmene narostlou přes noc v tekutém YPAD médiu naředit na  $OD_{595} \sim 0.15$  do 50 ml tekutého YPAD média a nechat růst (cca 5 hod) na  $OD_{595} \sim 0,8$  (0,7-0,9).  $OD$  zkontrolovat cca po 3 hodinách a potom kontrolovat dle nárůstu.

Kulturu inkubovat asi 2-5 min na ledové lázni a poté centrifugovat (1000 g, 5 min, 4 °C), médium odstranit.

Buňky resuspendovat v 35 ml vychlazeného lyzačního pufru (bez inhibitorů a detergentu), centrifugovat (1000 g, 3 min, 4 °C), odstranit supernatant. Resuspendovat v 1 ml téhož pufru, převést do 2ml mikrozkušavky a centrifugovat (1000 g, 3 min, 4 °C). Odstranit supernatant a umístit mikrozkušavky do -80 °C (je možné je předtím rychle zamrazit ponořením do tekutého dusíku, poté přesunout do mrazáku).

Čerstvě vyrobit lyzační pufr s inhibitory a detergentem. Pracovat stále na ledové lázni.

Do mikrozkušavky se šroubovacím víčkem přidat 0,8-0,9 g skleněných kuliček (omytých přes noc v 0,1 M HCl, opláchnutých  $mpH_2O$  do neutrálního pH a osušených). Zkušavky s kuličkami dát vychladit na ledovou lázeň.

Ke zmrazeným buňkám přidat 300  $\mu$ l vychlazeného lyzačního pufru s inhibitory a detergentem, potom buňky rychle rozmrazit (180 rpm, cca 1 min, 20 °C) a poté dát vychladit na ledovou lázeň.

Přenést suspenzi buněk do zkumavek s předchlazenými skleněnými kuličkami a rozbít buňky v homogenizátoru (MP, Fast Prep®-24) rychlostí 5,5 m/s, 13 s. Opakovat rozbíjení třikrát, mezi každým opakováním chladit mikrozkušavky 5 min v ledové lázni.

Po rozbítí buněk opět ochladit zkumavky 5 min v ledové lázni. Poté propíchnout dna a víčka zkumavek nažhavenou jehlou (0,45x25 mm) a každou zkumavku zasunout do nové 1,5ml mikrozkušavky.

Vložit mikrozkušavky na sobě do 50ml centrifugační zkumavky a odstředit buněčný lyzát do spodní mikrozkušavky (1000 g, 3 min, 4 °C). Kuličky propláchnout 300  $\mu$ l vychlazeného lyzačního pufru s inhibitory a detergentem a znovu centrifugovat (1000 g, 3 min, 4 °C), mikrozkušavku s kuličkami odstranit.

Centrifugovat lyzát vytočený z kuliček (20000 g, 10 min, 4 °C), supernatant přenést do čisté mikrozkušavky.

Kvantifikovat množství proteinů v každé zkumavce (viz kapitola 3.2.19 nebo 3.2.20; rozpouštědlem je zde lyzační pufr s inhibitory a detergentem). Po celou dobu chladit v ledové lázni.

Odebrat část buněčného lyzátu (input, lyzát obsahující všechny proteiny vstupující do precipitace) pro elektroforetickou analýzu (viz kapitola 3.2.23 a dále). Smíchat 1:1 s 2x Laemmliho pufrem, povařit 10 min v 95 °C, uchovávat v -80 °C.

Znovu čerstvě vyrobit požadované množství lyzačního pufru s inhibitory a detergentem a zředit v něm všechny vzorky na 2 mg/ml tak, aby celkový objem zředěného lyzátu byl cca 1,3-1,4 ml. Následuje precipitace zředěného lyzátu (viz kapitola 3.2.21 nebo 3.2.22).

Zbýlé buněčné lyzáty je možné uchovávat v -80 °C naředěné na 4 mg/ml.

#### **Použité roztoky:**

- **Lyzační pufr:** 40 mM HEPES, 5 % (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl
  - upravit pH pomocí NaOH na 7,6, uchovávat ve 4 °C
- **Lyzační pufr s inhibitory a detergentem:**
  - k lyzačnímu pufru přidat:
    - 0,8% (v/v) octylphenoxypolyethoxyethanol (Igepal CA-630)
    - 1% (v/v) inhibitory proteáz v DMSO (maximálně 4 týdny staré)
    - 1% (v/v) inhibitory fosfatáz
  - inhibitory přidávat vždy těsně před použitím; chladit v ledové lázni
- **2x Laemmliho pufr** - viz 3.2.17

### **3.2.19 Měření koncentrace proteinů dle Bradfordové (Bio-Rad Protein Assay)**

Koncentrát barvicího roztoku naředit čtyřnásobným množstvím destilované deionizované vody, přefiltrovat pro zbavení se pevných částecek.

Připravit standardy neboli vzorky o známé koncentraci proteinů, zde BSA (hovězí sérový albumin), o celkovém objemu 50 µl do 1,5ml mikrozkušavek:

	<b>koncentrace BSA</b>	<b>BSA (2 mg/ml)</b>	<b>rozpouštědlo</b>	<b>mpH<sub>2</sub>O</b>
blank	0 mg/ml	0 µl	5 µl	45 µl
S <sub>1</sub>	0,2 mg/ml	5 µl	5 µl	40 µl
S <sub>2</sub>	0,4 mg/ml	10 µl	5 µl	35 µl
S <sub>3</sub>	0,6 mg/ml	15 µl	5 µl	30 µl
S <sub>4</sub>	0,8 mg/ml	20 µl	5 µl	25 µl

5 µl každého vzorku naředit 45 µl mpH<sub>2</sub>O.

20 µl standardů nebo vzorků přidat k 1 ml naředěného barvicího roztoku a promíchat. Od každého standardu a vzorku vytvořit duplikát. Inkubovat alespoň 5 minut v laboratorní teplotě (ne více než jednu hodinu). Absorbance se bude postupně zvyšovat.

Na spektrofotometru měřit absorbanci při  $\lambda = 595$  nm, vynulovat na blank.

Zkonstruovat křivku závislosti absorbance na známé koncentraci standardů BSA, proložit lineární regresní přímkou a pomocí její rovnice vypočítat koncentraci vzorků (při výpočtu zohlednit desetinásobné ředění vzorků):

$y = ax + b$ , kde  $y$  = absorbance,  $x$  = koncentrace/10

### 3.2.20 Měření koncentrace proteinů dle Lowryho (DC Protein Assay)

Připravit standardy (50 µl) do 0,5ml mikrozkušavek:

	<b>koncentrace BSA</b>	<b>BSA (2 mg/ml)</b>	<b>rozpouštědlo</b>	<b>mpH<sub>2</sub>O</b>
blank	0 mg/ml	0 µl	5 µl	45 µl
S <sub>1</sub>	0,2 mg/ml	5 µl	5 µl	40 µl
S <sub>2</sub>	0,5 mg/ml	12,5 µl	5 µl	32,5 µl
S <sub>3</sub>	1 mg/ml	25 µl	5 µl	20 µl
S <sub>4</sub>	1,5 mg/ml	37,5 µl	5 µl	7,5 µl

5 µl každého vzorku naředit 45 µl mpH<sub>2</sub>O.

Připravit zásobní směs podle počtu vzorků - na každý 1 ml roztoku A přidat 20 µl roztoku S (pokud jsou ve vzorku detergenty, pokud ne, použije se jen roztok A).

Ke 125 µl směsi A+S přidat 25 µl standardů nebo vzorků. Od každého standardu a vzorku udělat duplikát. Promíchat a krátce centrifugovat.

Přidat 1 ml roztoku B a ihned promíchat, inkubovat 15 min (ne více než 1 hodinu) v laboratorní teplotě.

Na spektrofotometru měřit absorbanci při  $\lambda = 750$  nm, vynulovat na blank.

Dle naměřených hodnot vypočítat koncentraci vzorků stejně jako v kapitole 3.2.19.

### 3.2.21 Koimunoprecipitace

(Upraveno dle Keogh Lab Protocols, viz <https://sites.google.com/site/mckeogh2/protocols> – Immunoprecipitation; a dle Garcia et al., 2012)

*Modifikace metody budou uvedeny v kapitole Výsledky.*

K buněčnému lyzátu o objemu 1,3-1,4 ml a koncentraci 2 mg/ml (příprava viz kapitola 3.2.18) v 1,5ml mikrozkuhavce přidat 5  $\mu$ l protilátky anti-HA (Covance, viz 3.1.5; doporučené ředění pro imunoprecipitaci 1:150), ředění protilátky v lyzátu tedy bude 1:260-1:280. Lyzát nechat točit na „kolotoči“ 2 hod ve 4 °C.

Do 1,5ml mikrozkuhavky vnést 40  $\mu$ l protein A sepharózy (*nProtein A Sepharose 4 Fast Flow*).

Matrici resuspendovat v 1 ml lyzačního pufru bez inhibitorů a detergentu a usadit centrifugací (1000 g, 2 min, laboratorní teplota), odstranit supernatant. Toto promytí zopakovat. Třetí promývání provést s 500  $\mu$ l lyzačního pufru s inhibitory a detergentem, supernatant odstranit.

Lyzát inkubovaný s protilátkou usadit centrifugací (5500 g, 2 min, 4 °C). Lyzát pak přidat k promyté protein A sepharóze a inkubovat na „kolotoči“ 4 hodiny ve 4 °C.

Protein A sepharózu usadit centrifugací (1000 g, 2 min, 4 °C). Opatrně odsát supernatant jehlou 0,30x12 mm. Před prací s dalším vzorkem jehlu vždy promýt lyzačním pufrem.

Část supernatantu (neboli *flow through*, tedy lyzát obsahující proteiny nenavázené na matrici) smíchat 1:1 s 2x Laemmliho pufrem a uchovat v -80 °C pro pozdější elektroforetickou analýzu (viz kapitola 3.2.23 a dále).

Resuspendovat imunoprecipitát (protein A sepharózu) ve 25 objemech lyzačního pufru s inhibitory a detergentem (tj. 1 ml na 40  $\mu$ l matrice). Lehce promíchat a usadit centrifugací (1000 g, 2 min, 4 °C). Odsát opatrně supernatant, promýt 1 ml lyzačního pufru s detergentem a centrifugovat. Opět odsát opatrně supernatant, resuspendovat v 500  $\mu$ l lyzačního pufru

s detergentem a přenést do nové 1,5ml mikrozkušavky, starou mikrozkušavku opět propláchnout 500  $\mu$ l lyzačního pufru s detergentem a přenést k lyzátu s maticí v nové mikrozkušavce (kvůli zbavení se proteinů adsorbovaných na plastovém povrchu), centrifugovat.

Po posledním propláchnutí opatrně odstranit supernatant a resuspendovat protein A sepharózu ve 20  $\mu$ l vody a 20  $\mu$ l 2x Laemmliho pufru, inkubovat 10 min v 95 °C. Nakonec centrifugovat (5000 g, 30 s, laboratorní teplota), přesunout supernatant do nové 1,5ml mikrozkušavky a uložit do -80 °C. Tento vzorek (neboli eluát či precipitát, obsahující proteiny, které se navázaly na maticí) poté analyzovat elektroforeticky (viz kapitola 3.2.23 a dále).

#### **Použité roztoky:**

- **Lyzační pufr** – viz 3.2.18
- **Lyzační pufr s inhibitory a detergentem** - viz 3.2.18
- **2x Laemmliho pufr** - viz 3.2.17

### **3.2.22 Afinitní purifikace pomocí glutathion agarózy**

*(Upraveno dle 3.2.21)*

*Modifikace metody budou uvedeny v kapitole Výsledky.*

Přípravit buněčný lyzát obdobně jako v kapitole 3.2.18, ale každý vzorek připravovat z dvojnásobného množství kultury. Nakonec veškerý lyzát naředit na koncentraci proteinů 5 mg/ml do 15ml zkumavky.

Do nové 15ml zkumavky vnést 133  $\mu$ l zásobního roztoku 75% glutathion agarózy (*Protino Glutathion Agarose 4B*).

Glutathion agarózu resuspendovat v 10 objemech (1 ml) lyzačního pufru bez inhibitorů a detergentu a centrifugovat (500 g, 3 min, laboratorní teplota), supernatant odstranit. Promytí zopakovat. Nakonec resuspendovat v 1 objemu (100  $\mu$ l) lyzačního pufru s inhibitory a detergentem.

Lyzát přidat k roztoku a inkubovat na „kolotoči“ 3 hodiny ve 4 °C.

Glutathion agarózu centrifugací usadit (1500 g, 3 min, 4 °C). Jehlou 0,30x12 mm opatrně odsát supernatant. Při střídání jednotlivých vzorků promývat jehlu lyzačním pufrem.



Malou část supernatantu (*flow through*) smíchat 1:1 s 2x Laemmliho pufrům a uchovat v -80 °C pro pozdější analýzu.

Resuspendovat glutathion agarózu s navázanými proteiny v 600 µl lyzačního pufru s detergentem. Lehce promíchat, přesunout do nové 1,5ml mikrozkušavky, starou zkušavku znovu propláchnout 600 µl lyzačního pufru s detergentem a přenést k lyzátu s matricí, centrifugovat (1500 g, 3 min, 4 °C). Odsát opatrně supernatant, promýt 1,2 ml lyzačního pufru s detergentem a znovu centrifugovat. Opět odsát opatrně supernatant, resuspendovat v 1,2 ml lyzačního pufru s inhibitory a detergentem a usadit centrifugací.

Opatrně odstranit supernatant a resuspendovat glutathion agarózu v 50 µl 3x Laemmliho pufru, inkubovat 10 min v 95 °C. Centrifugovat (3000 g, 3 min, laboratorní teplota), supernatant přenést do nové 1,5ml mikrozkušavky a uložit do -80 °C. Takto získaný eluát poté analyzovat elektroforeticky.

#### **Použité roztoky:**

- **Lyzační pufr** – viz 3.2.18
- **Lyzační pufr s inhibitory a detergentem** - viz 3.2.18
- **3x Laemmliho pufr** - 0,168 M Tris, pH 6,8; 5,13% (w/v) SDS; 18% (v/v) glycerol; 0,003% bromfenolová modř

### **3.2.23 Tris-glycinová SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza proteinů**

#### **Příprava gelů a aparatury**

Na tácu podle návodu k soupravě sestavit aparaturu pro nalévání gelů na tácu: Připravit dvě skla s 0,75mm mezerou na gel, omýt je ethanolem a nechat oschnout, vložit je do nosiče a na rovném pevném povrchu je pečlivě vyrovnat vůči sobě. Potom zaklapnout svorky nosiče a vložit do aparatury na houbičku, která může být otřená ethanolem. Zkontrolovat, jestli jsou skla dobře utěsněná propláchnutím ethanolem. Pokud ethanol neprotéká, vysát ethanol buničinou nebo filtračním papírem a nechat skla vyschnout.

Připravit separační gel o požadované koncentraci akrylamidu (7,5, 10 nebo 12% dle velikosti analyzovaných proteinů):

2,50 ml/7,5% gel, 2,08 ml /10% gel, 2 ml/12% gel	mpH <sub>2</sub> O
1,25 ml/gel	4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8
1,25 ml/7,5% gel, 1,67 ml/10% gel, 1,75 ml/12% gel	protogel 30% AA/0, 8% BIS
3,4 µl/gel	TEMED (tetramethyldiamin)
16,5 µl/gel	10% (w/v) peroxodisíran amonný

V kádince smíchat zásobní roztoky ve výše uvedeném pořadí tak, aby vznikalo co nejméně bublinek, důkladně zamíchat (bez bublin) a okamžitě nanést do aparatury tak, aby zbylo místo pro nanesení asi 5 mm vysokého zaostřovacího gelu.

Nanesený gel opatrně převrstvit vodou (nebo izopropanolem), aby se zabránilo přístupu kyslíku, který zabraňuje polymeraci gelu. Po polymeraci (maximálně 20 min) se znovuobjeví rozhraní mezi vodou (nebo izopropanolem) a gelem.

Po polymeraci gelu vodu (nebo izopropanol) důkladně odsát mikrodávkovacím Hamilton a gel nechat 3 minuty vyschnout.

Separační gel lze po převrstvení 4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8 skladovat ve 4 °C do druhého dne.

Připravit zaostřovací gel:

620 µl/ml	mpH <sub>2</sub> O
250 µl/ml	4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8
130 µl/ml	protogel 30% AA/0, 8% BIS
1,4 µl/ml	TEMED (tetramethyldiamin)
7 µl/ml	10% (w/v) peroxodisíran amonný

V kádince smíchat zásobní roztoky ve výše uvedeném pořadí tak, aby vznikalo co nejméně bublinek, důkladně zamíchat a okamžitě nanést do aparatury na separační gel a vložit hřebínek tak, aby se neudělaly bubliny. Po pár minutách zkontrolovat, zda se netvoří bubliny a případně ještě přilít trochu polymerační směsi.

Po polymeraci zaostřovacího gelu opatrně vytáhnout hřebínek a jamky důkladně propláchnout elektrodovým pufrem, aby se odstranily případné kousky gelu v jamkách.

Skla s gely vložit do aparatury, prostor mezi skly naplnit elektrodovým pufrem a ověřit, zda pufir neprotéká aparaturou.

## **Příprava vzorků a vlastní elektroforéza**

20  $\mu$ l vzorku v Laemmliho pufru smíchat s 1,2  $\mu$ l 1 M DTT a denaturovat proteiny 5-10 min v 95 °C. Poté vzorek centrifugovat (15 s, 16000 g).

Do jamek gelu nanést mikrodávkovacím Hamilton proteinové vzorky. Do alespoň jedné z jamek každého gelu nanést 2,5  $\mu$ l velikostního standardu (viz kapitola 3.1.6). Mikrodávkořač po nanesení každého vzorku propláchnout elektrodovým puřrem a mpH<sub>2</sub>O.

Aparaturu s gely vložit do hlavní nádoby a naplnit ji elektrodovým puřrem, napojit na zdroj napětí. Pro průřhod zaostřovacím gelem nastavit hodnotu konstantního proudu na 10 mA/0,75mm gel (pro dva gely v jedné aparatuře 20 mA), po vřtupu vzorků do separačního gelu (když se marker začíná rozdělovat) zvýřit hodnotu konstantního proudu na 20 mA/0,75mm gel (tedy 40 mA pro dva gely).

Po dostatečném rozdělení vzorků aparaturu odpojit od zdroje napětí a gel vyjmout z aparatury. Gel lze poté rovnou barvit nebo dále použít pro přenos proteinů na membránu metodou western blot (viz kapitola 3.2.24).

## **Barvení gelu**

Gely barvit nejméně 20 min (lze i přes noc) v barvicím roztoku, poté gel přenést do odbarvovacího roztoku. Nakonec opláchnout ve vodě a skladovat zavařeně v polyethylenové fólii.

## **Použité roztoky:**

- **AA/BIS:** 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) N,N'-metylenbisakrylamid
  - přefiltrovat přes 0,45  $\mu$ m filtr, skladovat v temnu ve 4 °C
- **4x Tris-HCl/SDS pH 8,8:** 1,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS
  - pH dorovnat 1 M HCl na 8,8, přefiltrovat přes 0,45  $\mu$ m filtr, skladovat ve 4 °C
- **4x Tris-HCl/SDS pH 6,8:** 0,5 M Tris-HCl, 0,4% (w/v) SDS
  - pH dorovnat 1 M HCl na 6,8, přefiltrovat přes 0,45  $\mu$ m filtr, skladovat ve 4 °C
- **5x elektrodový puřr:** 125 mM Tris, 950 mM glycín, 0,5% (w/v) SDS
  - pH dorovnat na 8,3
- **Barvicí roztok:** 20% (v/v) methanol; 0,117% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 0,051% (w/v) Bismarck Brown R; 7% (v/v) kyselina octová ve vodě
- **Odbarvovací roztok:** 5% (v/v) methanol, 7% (v/v) kyselina octová ve vodě

### 3.2.24 Western blot

Nastříhat dva 3mm filtrační papíry Whatman a nitrocelulózovou membránu na rozměr gelu. S nitrocelulózovou membránou manipulovat opatrně a jen pinzetou nebo v rukavicích, nechat ji sytit několik minut v transferovém pufru.

Polyakrylamidový gel po elektroforéze (viz kapitola 3.2.23) opatrně vyjmout z elektroforézové aparatury a ze skel, zaostřovací gel odstranit.

Ve vychlazeném transferovém pufru sestavit „sendvič“ pro Western blot. Naskládat na sebe v uvedeném pořadí černou plastovou desku, těsnící houbičku, filtrační papír, gel, membránu, druhý filtrační papír a druhou těsnící houbičku. Ze všech vrstev vytlačit vzduch převálcováním zkumavkou, přikrýt čirou plastovou deskou a „sendvič“ uzavřít.

„Sendvič“ zasunout do držáku v blotovací (a elektroforézové) nádobě tak, aby čirá deska směřovala ke kladnému pólu (červený) a černá deska k zápornému pólu (černý). Do blotovací nádoby nalít vychlazený transferový pufr, vložit nádobku s ledem, míchadlo a míchat na magnetické míchače.

Napojit aparaturu na zdroj napětí a nechat probíhat přenos proteinů z gelu na membránu při 90–110 V 90–120 min. Přibližně po 30 minutách vyměňovat led.

Po skončení přenosu odpojit zdroj napětí, rozebrat aparaturu, membrány a gel vyndat ze „sendviče“. Velikostní standard by měl na membráně být dobře viditelný.

Gel lze po přenosu obarvit (viz kapitola 3.2.23).

Membránu s přenesenými proteiny opláchnout v pufru TBS (*Tris-buffered saline*). Membránu lze poté skladovat lehce osušenou ve filtračním papíru v -20 °C nebo ihned provést imunodetekci protilátkou (viz kapitola 3.2.25).

#### Použité roztoky:

- **Transferový pufr:** 25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% (v/v) methanol
- **Pufr TBS:** 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl

### 3.2.25 Imunodetekce proteinů na membráně

*Imunodetekce pomocí konjugátu protilátky s alkalickou fosfatázou.*

Membránu s přenesenými proteiny promýt roztokem TBS 10 min na třepačce, poté blokovat 1,5 hod v laboratorní teplotě (nebo 30 min ve 37 °C) v roztoku 5% mléka a 0,1% TTBS za mírného kývání.

Membránu po třech stranách zatavit do polyethylenové fólie, přidat roztok primární protilátky (ředění používaných protilátek je uvedeno v kapitole 3.1.5) ředěné v 5% (w/v) mléce a 0,05% TTBS. Zatavit i zbývající stranu membrány tak, aby nevznikly bubliny, a inkubovat na mírného kývání 3 hod v laboratorní teplotě nebo přes noc ve 4 °C.

Roztok s protilátkou lze uchovávat v 0,1% (v/v) azidu sodném ve 4 °C pro opakované použití.

Pokud je použita sekundární protilátka: Membránu vyjmout, opláchnout v roztoku 0,05% TTBS a poté odmývat 3x 10 min v 0,05% TTBS. Zatavit membránu do polyethylenové fólie s roztokem sekundární protilátky ředěné v 3% (w/v) mléce a 0,05% TTBS a inkubovat 60 min na za mírného kývání v laboratorní teplotě.

Po skončení inkubace membránu opláchnout 3x 10 min v 0,05% TTBS a 5 min v TBS. Nakonec krátce opláchnout v AP pufru. Zatavit do polyethylenové fólie s vyvíjecím roztokem a inkubovat ve tmě v laboratorní teplotě nebo ve 37 °C do vybarvení.

Vyvíjení ukončit promytím membrány v 5–10 mM EDTA (pH 8,0), opláchnutím deionizovanou vodou a vysušením membrány. Membránu naskenovat a zatavit do sáčku.

#### **Použité roztoky:**

- **TBS:** 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl
- **0,05% TTBS:** TBS s 0,05% (v/v) Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát)
- **0,1% TTBS:** TBS s 0,1% (v/v) Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonolaurát)
- **AP pufr:** 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- **Vyvíjecí roztok:** AP pufr obohacený o 1% (v/v) Reagent A a 1% (v/v) Reagent B
- **Reagent A:** 3% (w/v) NBT (*nitro-blue tetrazolium chloride*) v 70% (v/v) DMF (*N,N-Dimethylformamide*)
- **Reagent B:** 1,5% (w/v) BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate p-toluidine salt*) v DMF (*N,N-Dimethylformamide*)

## **4 Cíle práce**

- Vytvořit takové kvasinkové kmeny, z jejichž proteinových extraktů bude následně možné testovat proteinové interakce dvěma různými purifikačními metodami.
- Vyzkoušet a optimalizovat metodu koimunoprecipitace a afinitní purifikace GST pro hledání fyzických interakcí.
- Hledat fyzické interakce faktorů regulujících transkripci s komponentou sestřihového aparátu, proteinem Prp45.
- Ověřit existenci interakce sestřihových faktorů Prp22 a Prp45.
- Blíže charakterizovat fyzickou interakci sestřihových faktorů Prp46 a Prp45.

## 5 Výsledky

Protein Prp45 je již několik let středem zájmu v naší laboratoři a předběžné výsledky naznačovaly, že právě on by mohl být jednou z fyzických spojek procesů transkripce a sestřihu (viz kapitola 2.3.1.3), a proto byl vybrán i pro další testování propojení těchto dvou procesů.

Jako jeho kandidátní partneři byli zvoleni někteří z těch nejpravděpodobnějších dle interakcí nalezených v dvouhybridním systému, a ti, o nichž jsme dle dostupné literatury mohli předpokládat, že se sestřihu budou účastnit (Albers *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2008, Moehle *et al.*, 2012; více viz kapitola 2.3.2). Obecně se jedná o regulátory chromatinu:

Ada2 - podjednotka HAT komplexů SAGA, ATAC

Ahc1 - podjednotka HAT komplexu ATAC

Yta7 - regulátor exprese histonů

Ngg1 - podjednotka HAT komplexů SAGA, ATAC

Eaf3 - podjednotka histon deacetylázového a současně podjednotka HAT komplexu

Vps75 - stimuluje HAT aktivitu, možná sestavuje nukleozomy

Jako pozitivní kontrola byla využita fyzická interakce proteinu Prp45 s proteinem Prp46, která byla dříve prokázána (Albers *et al.*, 2003). Tato interakce byla v této práci dále lokalizována v rámci proteinu Prp45 testováním interakce zkrácených verzí proteinu Prp45 s Prp46.

Dále byla testována fyzická interakce s jinou komponentou spliceosomu, proteinem Prp22. V tomto případě byla očekávána slabší interakce (Gahura *et al.*, 2009) a testování sloužilo jako kontrola citlivosti prováděné metody.

Pro hledání fyzických interakcí byly použity dvě metody koprecipitace proteinů. V obou případech byl získán precipitát proteinu Prp45 a na něj navázaných proteinů, a v něm byli poté pomocí protilátky hledáni jeho kandidátní partneři.

První metoda, koimunoprecipitace (viz kapitola 3.2.21, 3.2.23, 3.2.24 a 3.2.25), byla založena na navázání proteinu označeného značkou 3HA (hemaglutinin) pomocí protilátky na protein A sepharózu, druhý protein byl pak detekován protilátkou proti jeho značce GFP (zelený fluorescenční protein).

V druhé metodě, afinitní purifikaci (viz kapitola 3.2.22, 3.2.23, 3.2.24 a 3.2.25), byl protein označen značkou GST (glutathion S-transferáza), pomocí které byl navázán na glutathion agarózu, a druhý protein byl poté detekován protilátkou proti jeho značce TAP (dle tandemová afinitní purifikace). Tato metoda je snadno proveditelná ve větším měřítku a byla zvolena s cílem získat vyšší množství purifikovaného proteinu oproti koimunoprecipitaci.

## 5.1 Tvorba dvojité značených kmenů

Prvním krokem před koprecipitacemi bylo vytvoření kvasinkových kmenů, jež obsahovaly dva endogenně značené proteiny. Jednou značkou byl označen protein Prp45, resp. jeho zkrácené verze, a druhou značkou byl označen protein, jehož interakci s Prp45 jsme chtěli sledovat.

Takto dvojité značené kmény byly vytvořeny buď křížením kmenů, z nichž každý obsahoval po jedné značce, a nebo integrací požadovaného úseku obsahujícího danou značku do genomu kmene, jež druhou značku již endogenně obsahoval.

### 5.1.1 Kmeny obsahující značky HA a GFP

#### 5.1.1.1 Vlastní příprava kmenů

Kmen obsahující na 3' konci ORF (otevřeného čtecího rámce) genu *PRP45* značku *3HA* (AVY73; viz kapitola 3.1.2) byl vytvořen v minulosti v naší laboratoři integrací kazety *PRP45-3HA::NatMX6* do genomu komerčně získaného kmene BY4742 (A. Valentová, nepublikované výsledky).

Dále byly komerčně získány kmény opačného párovacího typu k výše uvedenému, nesoucí chromozomální kopii genu pro testované interakční partnery značenou na 3' konci ORF značkou *GFP* (kmény PRP46-GFP, PRP22-GFP, ADA2-GFP, AHC1-GFP, YTA7-GFP, NGG1-GFP, EAF3-GFP, VPS75-GFP; viz kapitola 3.1.2). Vznikly integrací kazety *XXX-GFP::His3MX*, kde *XXX* je gen pro protein, který jsme chtěli testovat, do rodičovského kmene BY4741.

Tyto komerčně získané kmény byly zkříženy s kmenem AVY73 (metoda viz kapitola 3.2.3). Vzniklí diploidi byli poté přivedeni ke sporulaci (viz kapitola 3.2.3), následně byli z jednotlivých spor získáni haploidi (viz kapitola 3.2.4) v monokloniích o různých



genotypech, kteří byli testováni na selekčních médiích. Byli vybráni takoví haploidi, kteří úspěšně rostli jak na médiu obsahujícím antibiotikum nourseothricin (obsahovali tedy kazetu *PRP45-3HA::NatMX6* s nourseothricinovou rezistencí), tak na médiu bez histidinu (obsahovali tedy kazetu *XXX-GFP::His3MX* s histidinem). Tito haploidi byli konzervováni pro dlouhodobé skladování (viz kapitola 3.2.2) a pojmenováni následovně:

<b>EHY04:</b>	<i>PRP22-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY05:</b>	<i>PRP22-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY08:</b>	<i>ADA2-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY09:</b>	<i>ADA2-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15 ura3Δ0</i>
<b>EHY10:</b>	<i>ADA2-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY11:</b>	<i>ADA2-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY12:</b>	<i>AHC1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY13:</b>	<i>AHC1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY14:</b>	<i>AHC1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY15:</b>	<i>AHC1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY16:</b>	<i>EAF3-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY17:</b>	<i>EAF3-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY18:</b>	<i>EAF3-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY19:</b>	<i>EAF3-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY20:</b>	<i>YTA7-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY21:</b>	<i>YTA7-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY22:</b>	<i>YTA7-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY23:</b>	<i>YTA7-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY24:</b>	<i>NGG1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<b>EHY25:</b>	<i>NGG1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>

- EHY26:** *NGG1-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY27:** *VPS75-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0*
- EHY28:** *VPS75-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0*
- EHY29:** *VPS75-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0*
- EHY30:** *VPS75-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY31:** *PRP46-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
- EHY32:** *PRP46-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0*
- EHY33:** *PRP46-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
- EHY34:** *PRP46-GFP::His3MX PRP45-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
- EHY35:** *PRP46-GFP::His3MX prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY36:** *PRP46-GFP::His3MX prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY37:** *PRP46-GFP::His3MX prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*
- EHY38:** *PRP46-GFP::His3MX prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0*

U těchto kmenů nebyl testován párovací typ, pro další pokusy nebylo potřeba jej znát.

Taktéž v naší laboratoři byly již dříve vyrobeny kmeny KAY08-KAY11 (více viz kapitola 3.1.2) obsahující na chromozómu zkrácenou verzi genu pro protein Prp45 značenou na 3' konci epitopem 3HA. Byly získány integrací kazety *prp45(1-131)-3HA::KanMX6*, *prp45(1-151)-3HA::KanMX6*, *prp45(1-162)-3HA::KanMX6* nebo *prp45(1-177)-3HA::KanMX6* do genomu komerčně získaného kmene EGY48 (K. Abrhánová, nepublikované výsledky).

Tyto kmeny byly zkříženy s partnerem opačného párovacího typu, komerčně získaným kmenem PRP46-GFP (viz kapitola 3.1.2), jež vznikl integrací kazety *PRP46-GFP::His3MX* do rodičovského kmene BY4741, následně proběhla sporulace a mikromanipulace tetrad stejně, jako bylo uvedeno výše. Selekcí byli vybráni takoví haploidi, kteří obsahovali obě potřebné značky:

<b>EHY66:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-177)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>1</sup> met15Δ0 ura3Δ</i>
<b>EHY67:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-177)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>1</sup> met15Δ0 ura3Δ</i>
<b>EHY68:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-162)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>2</sup> met15Δ0<sup>3</sup> ura3Δ trp1Δ</i>
<b>EHY69:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-162)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>2</sup> ura3Δ</i>
<b>EHY70:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-151)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>2</sup> met15Δ0 ura3Δ trp1Δ</i>
<b>EHY71:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-151)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>2</sup> ura3Δ trp1Δ</i>
<b>EHY72:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-131)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>2</sup> met15Δ0 ura3Δ trp1Δ</i>
<b>EHY73:</b>	<i>PRP46-GFP::His3MX prp45(1-131)-3HA::KanMX6 his3Δ leu2Δ<sup>2</sup> met15Δ0 ura3Δ trp1Δ</i>

Ani u těchto kmenů nebyl testován párovací typ, navíc nebylo objasněno, zda obsahují LexA(6xop)-*LEU2* kazetu, či ne; v obou případech buňky nebyly schopny růst na médiích bez leucinu. U kmene EHY68 se navíc nepodařilo potvrdit či vyvrátit methioninovou auxotrofii, růst tohoto kmene na médiu bez methioninu byl hraniční. Z předchozích zkušeností v naší laboratoři jde ale v případě methioninových auxotrofií o častý úkaz.

Pro další testování byly vybrány kmeny EHY05, EHY08, EHY14, EHY16, EHY20, EHY24, EHY27, EHY32, EHY34, EHY38, EHY66, EHY69, EHY71 a EHY72.

### 5.1.1.2 Ověřování přítomnosti značek

Před další prací s vytvořenými dvojité značenými kmeny bylo nutno ověřit přítomnost obou značek. To bylo možné více metodami.

---

1 Kmen nebyl testován na přítomnost kazety LexA(6xop)-*LEU2*.

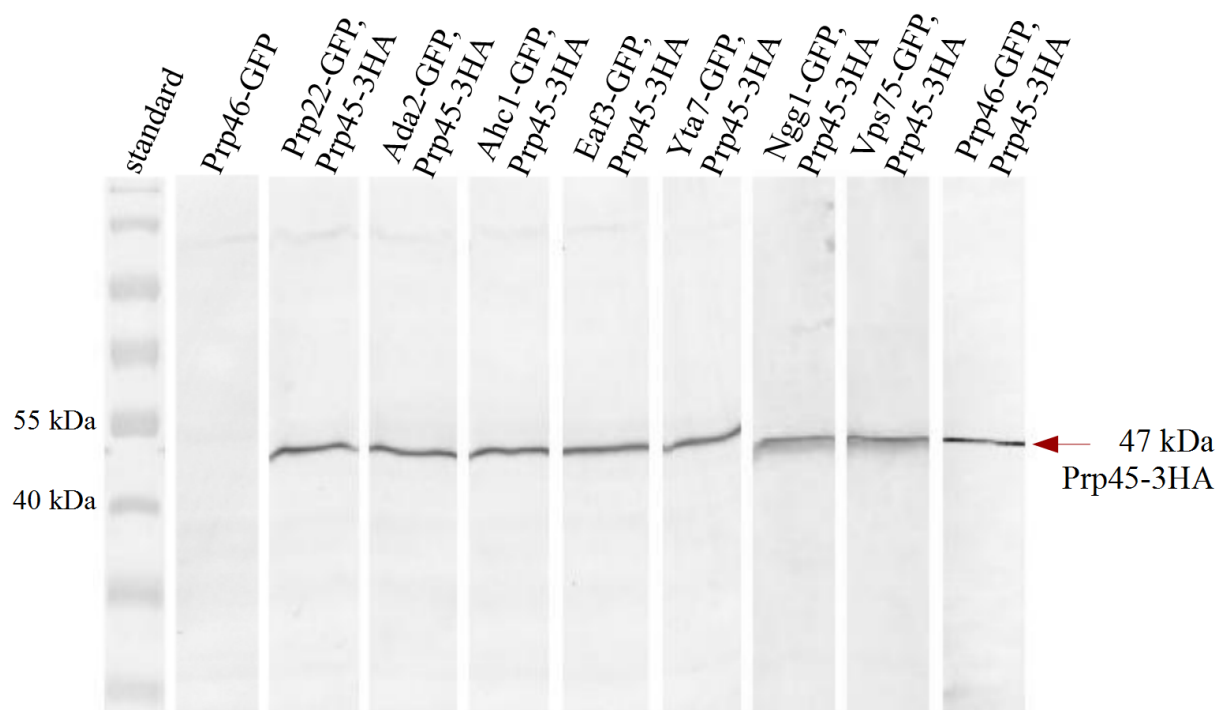
2 Kmen nebyl testován na přítomnost kazety LexA(6xop)-*LEU2*.

3 Růst tohoto kmene na médiu bez methioninu byl hraniční.

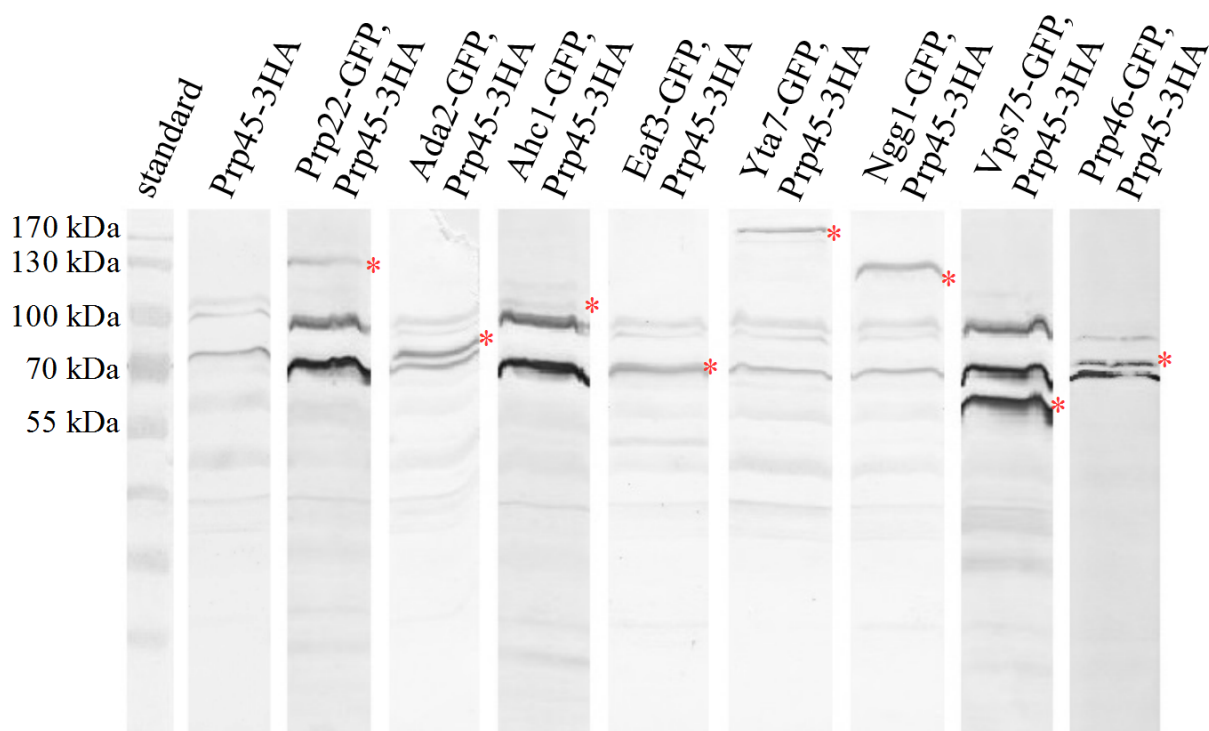
Obě značky lokalizované na C-konci exprimovaných proteinů byly detekovány pomocí specifické protilátky na nitrocelulózové membráně<sup>4</sup> (obrázky 15 a 16). Z kvasinek byly vytvořeny proteinové extrakty (viz kapitola 3.2.17), proteiny byly poté rozděleny na polyakrylamidovém gelu (viz kapitola 3.2.23) a přeneseny na nitrocelulózovou membránu (viz kapitola 3.2.24), která byla inkubována se specifickou protilátkou (viz kapitola 3.2.25). Alkalická fosfatáza konjugovaná s protilátkou vytvořila reakcí se substrátem na membráně barevný signál v podobě proužku. Značky HA byly tímto způsobem nalezeny u všech testovaných kmenů. Protilátka proti GFP ale nebyla zcela specifická, a na membráně se tak objevily i signály nepatřící pozorovaným proteinům. Jeden z nespecifických signálů byl velikostně velmi blízko fúznímu proteinu Eaf3-GFP, nebylo tedy možné jednoznačně potvrdit, že je tento protein v daném kvasinkovém kmeni přítomen. Signál patřící proteinu Ahc1-GFP byl poměrně slabý. Protein Ngg1-GFP byl detekován velikostně v jiné oblasti, než bylo očekáváno. Podle *Saccharomyces Genome Database* [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org) by měl mít samotný protein Ngg1 molekulovou hmotnost 79 kDa (kilo Daltonů), se značkou GFP pak 106 kDa. Dle obrázku 16 však měl velikost přibližně 130 kDa, což mohlo být způsobeno více faktory, například posttranslačními modifikacemi proteinu. Značky GFP u ostatních testovaných kmenů byly nalezeny v dostatečné intenzitě i odpovídající velikosti.

---

4 Přítomnost značek v kmenech EHY08, EHY16, EHY20 a EHY24 byla ověřena K. Abrahámovou.



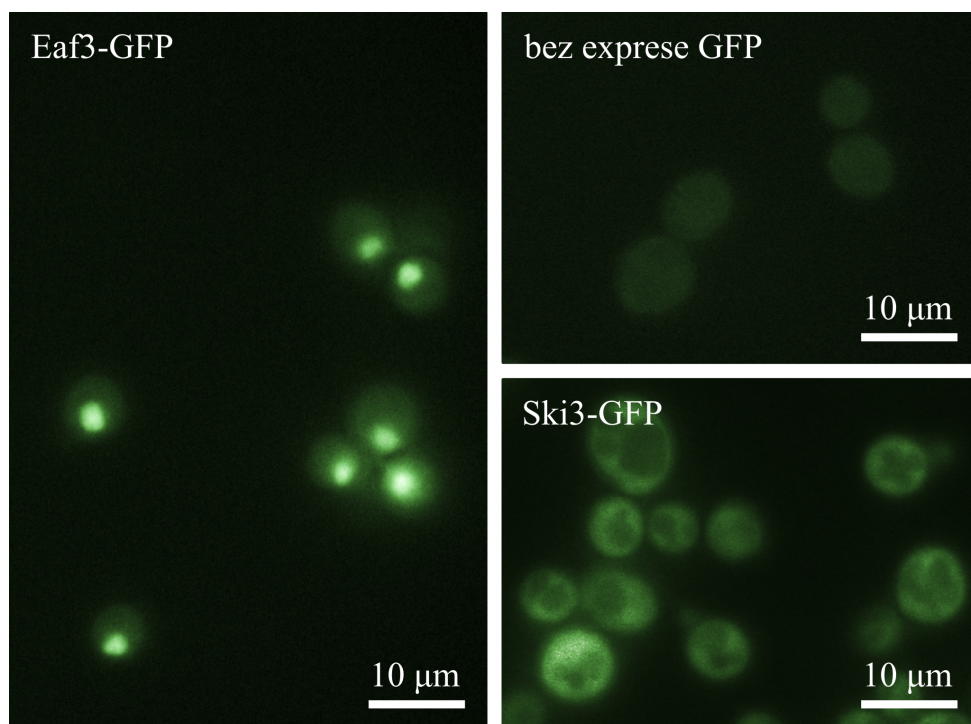
Obrázek 15: Ověření exprese proteinu Prp45 se značkou 3HA imunodetekcí. Proteiny extrahované z příslušných kvasinkových kmenů byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a následně přeneseny na membránu metodou western blot. Detekována byla značka 3HA protilátkou proti HA (HA-7; viz 3.1.5). Umístění získaného signálu odpovídá předpokládané velikosti fúzního proteinu. Kmen obsahující pouze Prp46-GFP byl použit jako negativní kontrola.



Obrázek 16: Ověření exprese proteinů se značkou GFP imunodetekcí. Proteiny z extraktů příslušných kvasinkových kmenů byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu metodou western blot. K detekci byla použita protilátka proti značce GFP (viz 3.1.5). Tato protilátka detekovala mnoho nespecifit, nejsilněji v oblasti 70 a 100 kDa. Hvězdičkou jsou označeny oblasti detekovaných specifických signálů. Kmen obsahující pouze Prp45-3HA byl použit jako negativní kontrola. Očekávané velikosti detekovaných fúzních proteinů:

Prp22-GFP	- 157 kDa
Ada2-GFP	- 77 kDa
Ahc1-GFP	- 90 kDa
Eaf3-GFP	- 72 kDa
Yta7-GFP	- 184 kDa
Ngg1-GFP	- 106 kDa
Vps75-GFP	- 58 kDa
Prp46-GFP	- 77 kDa

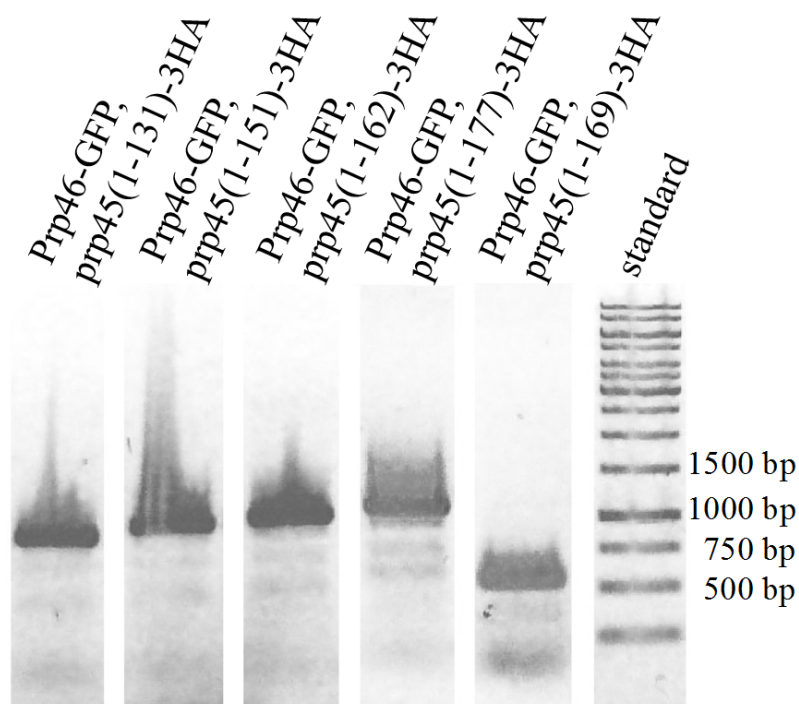
Z vytvořených dvojité značených kmenů byly některé (EHY05, EHY16, EHY27 a EHY38) orientačně pozorovány pod mikroskopem CellR pod zeleným fluorescenčním světlem pro další ujištění, že protein značený GFP je exprimován, a to v patřičné lokaci (obrázek 17).



Obrázek 17: Ukázka pozorování exprese značky GFP ve vytvořených kmenech. Jako příklad je zde uveden kmen nesoucí značku GFP za jaderným proteinem Eaf3 (vlevo). Pro srovnání je také ukázán příklad cytoplazmatické lokalizace této značky v kmeni SKI3-GFP (vpravo dole). Signál byl dále porovnáván s negativní kontrolou neexprimující žádnou značku (BY4741; vpravo nahoře).

Epitopy HA v dvojité značených kmenech obsahujících zkrácené verze proteinu Prp45 se nedařilo opakovaně ověřit imunodetekcí značek na nitrocelulóзовé membráně, v těchto kmenech byla tedy ověřována přítomnost fúzního genu o správné délce pomocí PCR (metoda viz kapitola 3.2.13). Přímý primer nasedal v oblasti *prp45* (AV18; více o primeru viz kapitola 3.1.3). Zpětný primer byl reverzně komplementární k úseku kazety za genem. U kmenů obsahujících za genem *prp45* kazetu *KanMX6* byl použit zpětný primer AV60 (více o primeru viz kapitola 3.1.3), u kmene obsahujícího za genem *prp45* kazetu *NatMX6* byl použit zpětný primer AV17 (více o primeru viz kapitola 3.1.3). Amplifikované úseky DNA byly analyzovány na agarózovém gelu (metoda viz kapitola 3.2.15). Délka všech výsledných produktů odpovídala očekávání, přítomnost odpovídajících fúzních genů s *3HA* byla tedy u všech kmenů vytvořených integrací ověřena (obrázek 18).

Protein GFP nebyl u vytvořených kmenů obsahujících zkrácené verze proteinu Prp45 značené epitopem 3HA ověřován, jeho exprese však byla ověřena v mateřských kmenech (neuváděno).



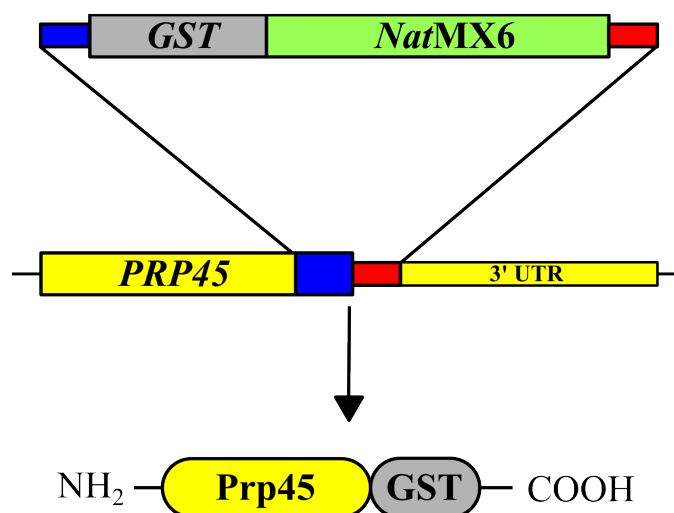
Obrázek 18: Ověření přítomnosti zkrácených verzí *prp45* s endogenními epitopy HA metodou PCR. Amplifikována byla 5' koncová část zkráceného genu *prp45* a část kazety *NatMX6* resp. *KanMX6*. Očekávané velikosti produktů:

<i>Prp46-GFP, prp45(1-131)-3HA:</i>	980 bp
<i>Prp46-GFP, prp45(1-151)-3HA:</i>	1040 bp
<i>Prp46-GFP, prp45(1-162)-3HA:</i>	1080 bp
<i>Prp46-GFP, prp45(1-177)-3HA:</i>	1120 bp
<i>Prp46-GFP, prp45(1-169)-3HA:</i>	510 bp

### 5.1.2 Kmeny obsahující značky GST a TAP

Pro hledání fyzických interakcí metodou precipitace pomocí glutathion agarózy byly připraveny kmeny obsahující protein Prp45 endogenně značený GST a současně jiný protein endogenně značený epitopem TAP. K dispozici byly komerčně získané haploidní kmeny obsahující fúzní proteiny se značkou TAP na C-konci (kmeny PRP46-TAP, ADA2-TAP, AHC1-TAP, YTA7-TAP, NGG1-TAP; viz kapitola 3.1.2). Do genomu těchto kmenů a kmene BY4741 (viz kapitola 3.1.2) byla homologní rekombinací vkládána kazeta obsahující protein *GST* za gen *PRP45* (obrázek 19).



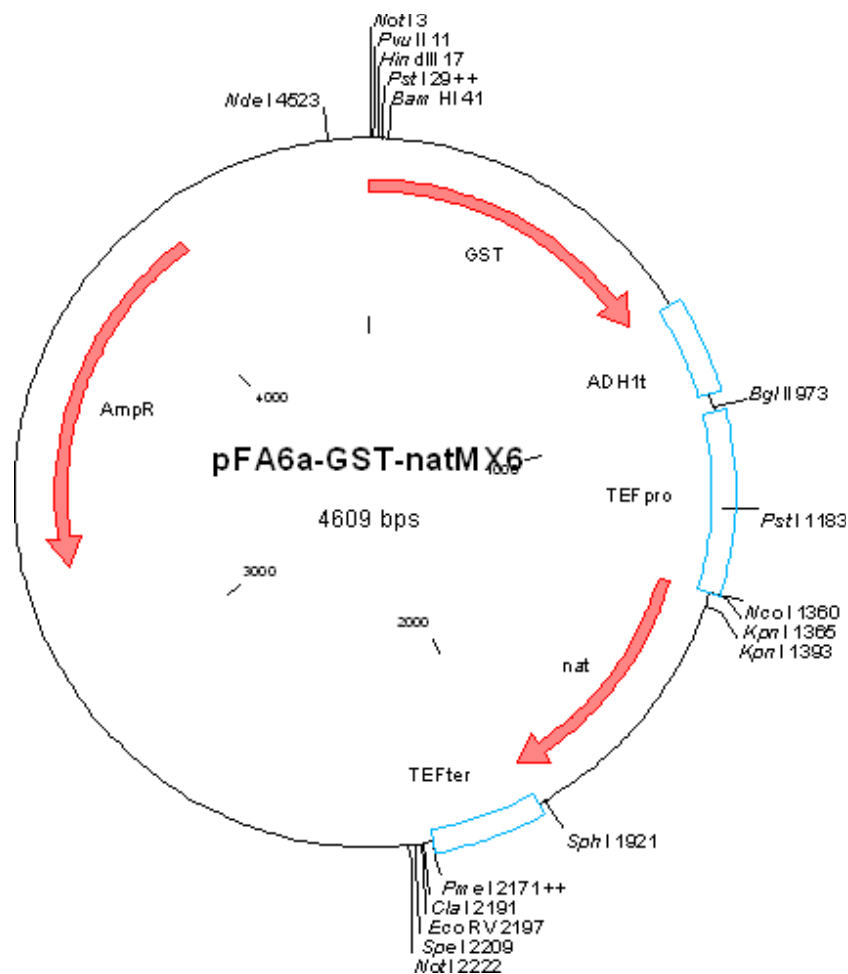


Obrázek 19: Schematické znázornění vkládání kazety s nourseothricinovou rezistencí a proteinem GST (nahore) do genomu kmenů s proteinem endogenně značeným epitopem TAP za gen *PRP45* (uprostřed). Z genu je následně exprimován fúzní protein značený GST na C-konci (dole).

### 5.1.2.1 Vlastní příprava kmenů

Komerčně získaný plazmid pFa6A-GST-natMX6 (p30414; Van Driessche *et al.*, 2005; obrázek 20) určený pro vkládání značky *GST* na 3' konec kvasinkových genů za použití metody PCR byl pro namnožení transformován do bakterií (metoda viz kapitola 3.2.6) a z narostlých kolonií byl opět izolován (metoda viz kapitola 3.2.8). Pro ověření byl plazmid restrikně štěpen (metoda viz kapitola 3.2.11), výsledné fragmenty se rozdělily na agarózovém gelu (metoda viz kapitola 3.2.15) podle očekávaných velikostí (obrázek 21).

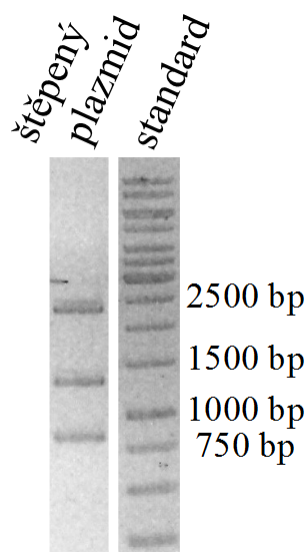
Izolovaný plazmid byl linearizován tak, aby oblast budoucí expresní kazety zůstala v celku, kazeta byla následně amplifikována pomocí PCR za použití primerů, jež nasedaly na sekvenci plazmidu jen z části. Zbytek sekvence primerů byl komplementární k cílovému úseku v kvasinkovém genu *PRP45*. Primer AV15 (více viz kapitola 3.1.3) nasedal na 5' konec budoucí kazety a jeho přesahující úsek byl komplementární k 3' konci genu *PRP45*. Zpětný primer KM10 (více viz kapitola 3.1.3) nasedal na 3' konec *TEF* terminátoru a přesahující úsek odpovídal úseku těsně za STOP kodónem *PRP45*. Kazeta *NatMX6* obsahuje velké množství stabilních CG párů, byly proto nastaveny poněkud odlišné podmínky reakce, než je uvedeno v kap. 3.2.13, a to dle Van Driessche *et al.*, 2005. Síran amonný a DMSO v reakční směsi usnadňují denaturaci DNA.



Obrázek 20: Plazmid pFA6a-GST-natMX6. Obsahuje gen pro rezistenci na antibiotikum ampicilin (AmpR), který je exprimován, pokud je plazmid transformován do bakterií. Do genomu kvasinek je vkládána oblast s GST a nourseothricinovou rezistencí (nat). Gen pro nourseothricinovou rezistenci je exprimován pod silným promotorem TEF (převzato z <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/P30414.html>).

Směs o celkovém objemu 50  $\mu$ l:

1x	reakční pufr se síranem amonným
5 %	DMSO
1,2 $\mu$ M	primer AV15
1,2 $\mu$ M	primer KM10
0,4 mM (každý)	deoxynukleotidtrifosfáty
2,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
cca 50 ng	templátová DNA
0,25 $\mu$ l	Taq polymeráza

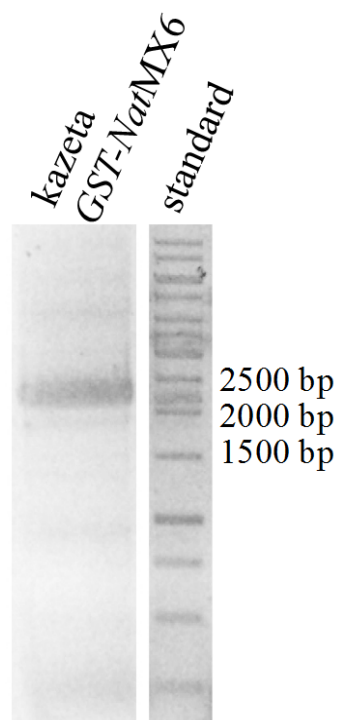


Obrázek 21: Restrikční ověření izolovaného plazmidu. Délka štěpených fragmentů byla zjišťována rozdělením na agarózovém gelu. Očekávané délky fragmentů byly 2390 bp, 1360 bp a 870 bp.

Program: 94 °C, 2 min; 10 x (94 °C, 30 s; 43 °C, 30 s; 68 °C, 3 min); 25 x (94 °C, 30 s; 43 °C, 30 s; 72 °C, 3 min + 5 s each run); 72 °C, 7 min; 15 °C, 1 min.

Reakce probíhala ve velkých objemech, bylo totiž potřeba získat co nejvíce produktu. Protože reakce neprobíhala optimálně, byly očekávány i nespecifické produkty PCR. Požadovaný amplifikovaný úsek musel být tedy následně přечиštěn od nespecifických produktů – produkty byly rozděleny na agarózovém gelu (obrázek 22) a ampikon v délce odpovídající požadovanému produktu byl z gelu vyříznut a purifikován (metoda viz kapitola 3.2.14). Purifikovaný produkt byl znovu ověřen analýzou na agarózovém gelu (neuváděno), kde se už vyskytoval pouze jeden proužek, a to v požadované velikosti. Byla tedy vytvořena kazeta připravená pro integraci do kvasinkového genomu homologní rekombinací.

Následně byla kazeta transformována (metoda viz kapitola 3.2.9) do kvasinkových kmenů PRP46-TAP, ADA2-TAP, AHC1-TAP, YTA7-TAP, NGG1-TAP a BY4741 (viz kapitola 3.1.2). Transformované kmeny byly po nárůstu na pevném neselekčním médiu přeneseny metodou „*replica plating*“ („přetiskávání“) na selekční médium bez histidinu obsahující přidáný nourseothricin, kde rostly pouze dvojité značené kmeny, nebo na médium s histidinem a nourseothricinem, kde rostly kmeny obsahující jen *PRP45-GST*. Z vybraných monoklonií byly vytvořeny nové kmeny:



Obrázek 22: Produkty PCR s částečně nasedajícími primery rozdělené na agarózovém gelu. Produkt o požadované velikosti 2200 bp (nejvýraznější proužek), což byla kazeta s konci homologními k úsekům cílového genu, byl následně z gelu vyříznut a přečištěn.

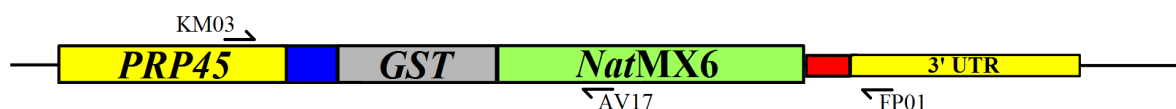
- EHY50:** MATa *PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY51:** MATa *PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY52:** MATa *PRP46-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY53:** MATa *PRP46-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY54:** MATa *PRP46-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY55:** MATa *ADA2-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY57:** MATa *ADA2-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY58:** MATa *AHC1-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY59:** MATa *AHC1-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*

- EHY60:** MATa *AHC1-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY61:** MATa *YTA7-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY63:** MATa *YTA7-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY64:** MATa *NGG1-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*
- EHY65:** MATa *NGG1-TAP::His3MX PRP45-GST::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*

Pro další experimenty byly použity kmeny EHY50, EHY53, EHY57, EHY58, EHY61 a EHY65.

### 5.1.2.2 Ověřování přítomnosti značek

Přítomnost vložené kazety se opakovaně nedařilo ověřit metodou colony PCR (metoda viz kapitola 3.2.13), z vytvořených kmenů byla proto izolována chromozomální DNA (metoda viz kapitola 3.2.10), a ta byla následně amplifikována. Amplifikované úseky DNA jsou vyznačeny na obrázku 23.

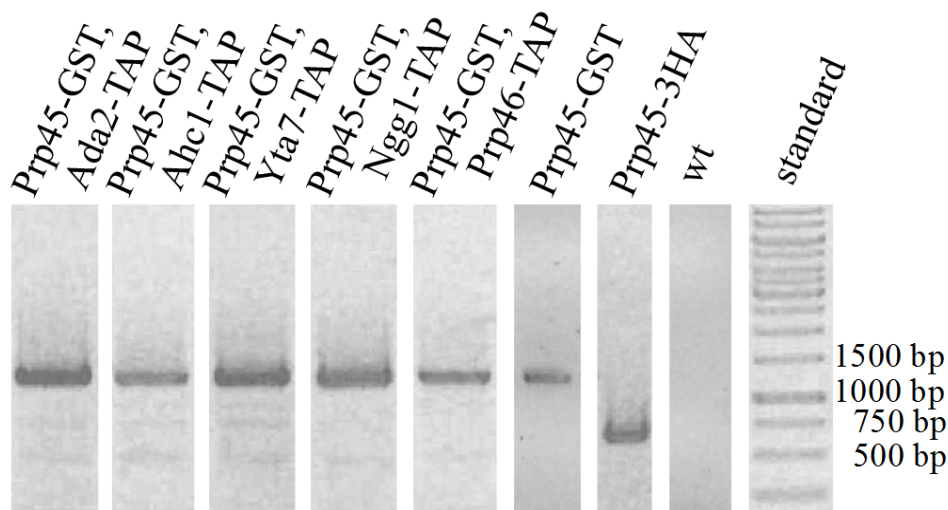


Obrázek 23: Schéma integrované kazety GST-NatMX6 a naznačení amplifikovaných úseků při ověřování její úspěšné integrace.

Nejprve byly k amplifikaci použity primery KM03 (více viz kapitola 3.1.3; na 3' konci *PRP45*) a AV17 (více viz kapitola 3.1.3; v kazetě), které v kmeni bez integrační kazety *NatMX6* nevytvoří žádný produkt. Podmínky reakce byly nastaveny stejně, jako je uvedeno v kapitole 3.2.13.

Program: 4 °C, 2 min; 28x (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, 72 °C, 1:20 min); 72 °C, 5 min; 10 °C, 2 min.

Následnou elektroforetickou analýzou byla potvrzena přítomnost správně dlouhých fragmentů u všech vytvořených kmenů (obrázek 24).



Obrázek 24: Ověření přítomnosti PRP45-GST v genomu vytvořených kmenů metodou PCR s primery KM03 a AVY17. Amplifikované úseky byly rozděleny na 1% agarózovém gelu. Očekávaná velikost amplifikovaného úseku u kmenů s integrovanou kazetou GST-NatMX6 je 1270 bp, u kmene s integrovanou kazetou 3HA-NatMX6 (AVY73) je 700 bp a u kmene divokého typu (BY4741) nevzniká žádný produkt.

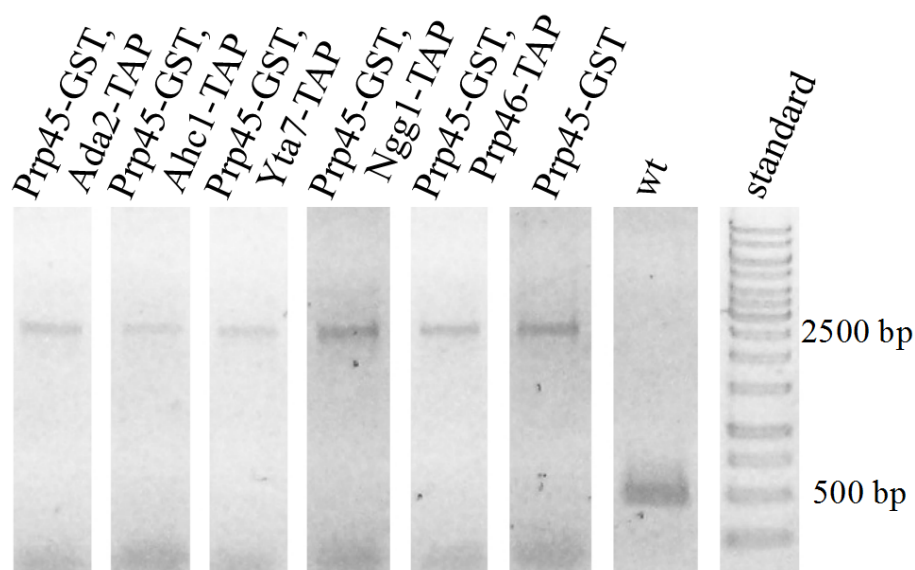
Posléze byly extrakty chromozomální DNA amplifikovány za použití primerů KM03 a FP01 (více viz kapitola 3.1.3; je reverzně komplementární k oblasti 3' UTR *PRP45* – tato oblast leží v kmenech obsahujících kazetu až za integrovanou oblastí), které vytvoří produkt i ve kmenech divokého typu, ten ale bude výrazně kratší. Podmínky reakce byly nastaveny stejně, jako je uvedeno v kapitole 3.2.13.

Program: 4 °C, 2 min; 28x (94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, 72 °C, 2:30 min); 72 °C, 5 min; 10 °C, 2 min.

Elektroforetickou analýzou amplifikovaných úseků s primery KM03 a FP01 byla ověřena přítomnost *PRP45-GST* u všech typů dvojité značených kmenů (obrázek 25).

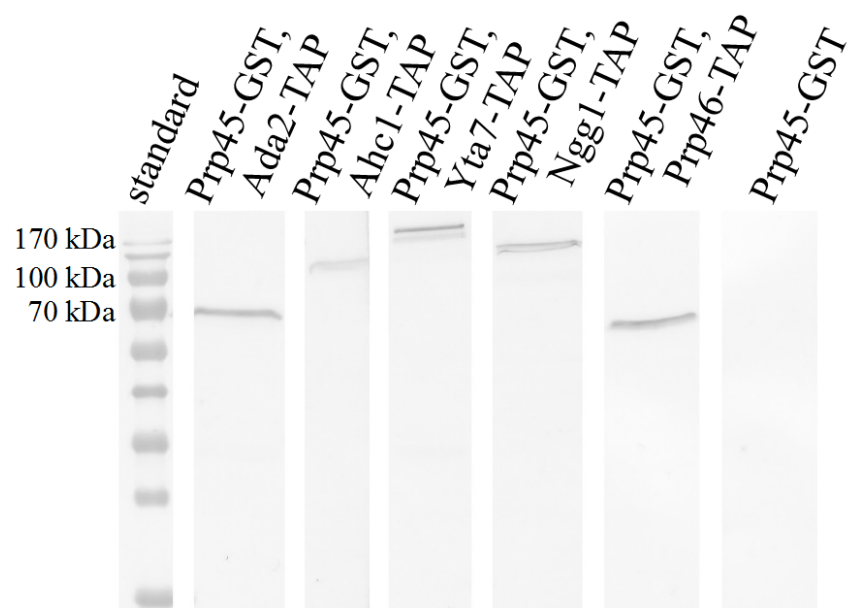
Expres proteinu Prp45-GST imunodetekcí na nitrocelulózové membráně nebyla náležitě ověřena, protože protilátka proti značce GFP (více viz kapitola 3.1.5) se velmi silně

vázala na značku TAP a signál značky GST na membráně byl na hranici možnosti detekce (neuváděno).



Obrázek 25: Ověření přítomnosti PRP45-GST v genomu vytvořených kmenů metodou PCR s primery KM03 a FP01. Amplifikované úseky DNA byly rozděleny na 1% agarózovém gelu. Očekávaná velikost amplifikovaného úseku u kmenů obsahujících kazetu GST-NatMX6 je 2600 bp a u kmene divokého typu 420 bp.

Expresí fúzních proteinů se značkou TAP však byla u dvojité tagovaných kmenů imunodetekcí protilátkou proti značce TAP na membráně úspěšně ověřena (obrázek 26). Protein Ngg1 měl opět cca o 30 kDa větší velikost, než je uváděno v *Saccharomyces Genome Database* [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org).



Obrázek 26: Ověření přítomnosti fúzních proteinů se značkou TAP ve vytvořených kmenech imunodetekcí. Z buněk byly připraveny proteinové extrakty, proteiny byly rozděleny na 7,5% polyakrylamidovém gelu a následně metodou western blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu, kde byla pomocí specifické protilátky detekována značka TAP. Očekávané velikosti detekovaných fúzních proteinů:

*Ada2-TAP* - 71 kDa  
*Ahc1-TAP* - 84 kDa  
*Yta7-TAP* - 178 kDa  
*Ngg1-TAP* - 100 kDa  
*Prp46-TAP* - 71 kDa



## 5.2 Optimalizace metod pro testování interakcí

Pokud protein Prp45 s některými regulátory transkripce vůbec interaguje, tyto interakce budou pravděpodobně slabé nebo méně časté. Před samotným testováním proteinových interakcí proto musela být zavedena funkční metoda, která byla posléze dále modifikována tak, aby byl získán co nejvyšší výtěžek precipitovaného proteinu, a tedy co nejsilnější signál při detekci jeho interakčního partnera.

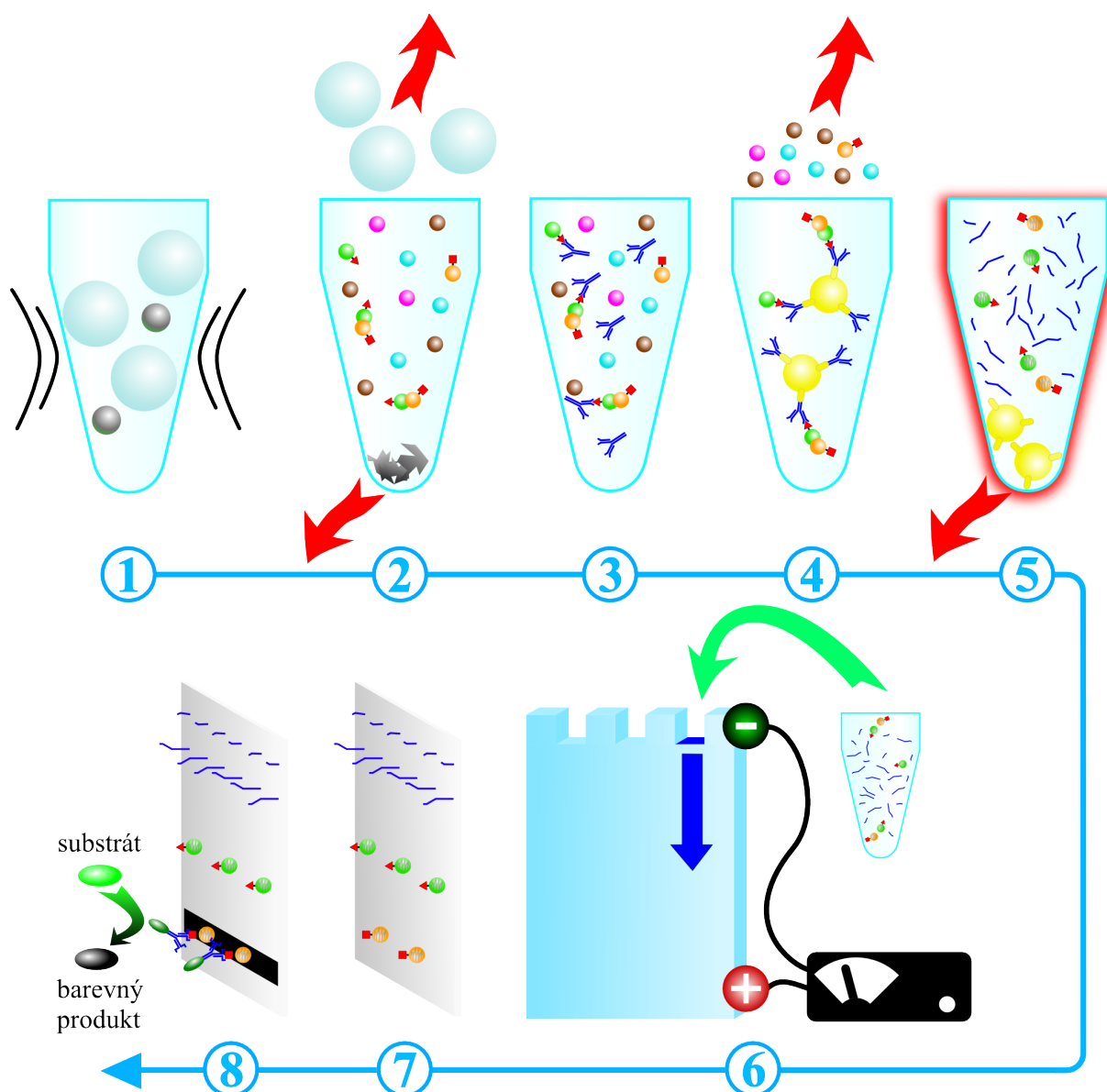
### 5.2.1 Koimunoprecipitace za značku HA a následná detekce značky GFP









Princip koimunoprecipitace proteinu za značku HA pomocí specifické protilátky a protein A sepharózy, a taktéž princip následné detekce je vysvětlen na obrázku 27. Podrobný postup metody je vypsán v kapitole 3.2.18, 3.2.19 (nebo 3.2.20), 3.2.21, a dále v kapitolách 3.2.23, 3.2.24 a 3.2.25.

Pro první pokus, který byl prováděn pouze s pozitivní (kmen obsahující Prp46-GFP, Prp45-3HA) a negativní kontrolou (kmen obsahující pouze Prp46-GFP), byla použita metoda koimunoprecipitace proteinu za značku 3HA pomocí protilátky anti-HA a protein A sepharózy tak, jak je uvedena v kapitole 3.2.21, s následujícími odlišnostmi:

- Lyzát byl inkubován s protilátkou anti-HA 3 hod ve 4 °C.
- S protein A sepharózou byl následně lyzát inkubován 1 hod ve 4 °C.
- Lyzát po inkubaci se sepharózou (který se jindy stane odpadem) byl přidán k nové protein A sepharóze a znovu inkubován 1 hod ve 4 °C.
- Po odváznání proteinů z matrice povařením v Laemmliho pufru byla oddělená protein A sepharóza znovu smíchána s Laemmliho pufrem a ještě jednou povařena.

Výsledky koimunoprecipitace jsou na obrázcích 28, 29 a 30.

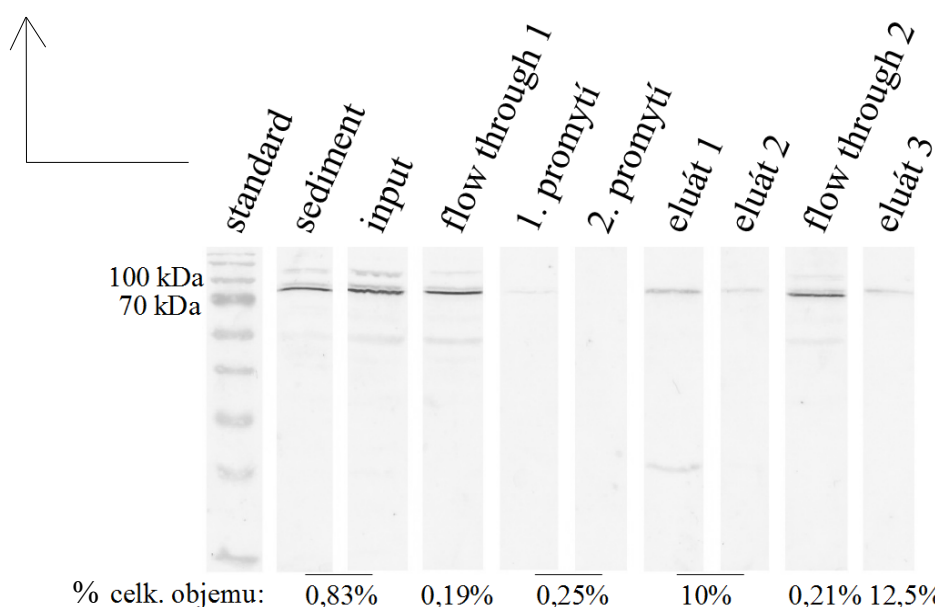


-  Skleněná kulička
-  Buňka
-  Protein X se značkou GFP
-  Protein Y se značkou HA
-  Rozbitá buňka
-  Protilátka proti značce HA
-  Sepharózová kulička
-  Buněčné proteiny
-  Protilátka proti značce GFP konjugovaná s alkalickou fosfatázou

Obrázek 27: Princip koimunoprecipitace. (1) Buňky jsou nejdříve rozbity skleněnými kuličkami. (2) Zbytky buněk se odstraní a je získán proteinový extrakt. (3) Proteiny jsou inkubovány s protilátkou proti značce HA. (4) Na protein A sepharózu je navázána protilátka s již navázaným fúzním proteinem se značkou HA a na něj připojené proteiny. (5) Precipitát je uvolněn ze sepharózy. (6) Získaný precipitát je elektroforézou rozdělen na polyakrylamidovém gelu. (7) Rozdělené proteiny jsou přeneseny metodou western blot na nitrocelulózovou membránu. (8) Specifickou protilátkou je na membráně rozpoznán protein se značkou GFP a následně je vizualizován barevnou reakcí alkalické fosfatázy na protilátce se substrátem.

Analyzované vzorky:

sediment	pevné části rozbitých buněk oddělené od supernatantu (proteinů) po rozbití buněk na homogenizátoru
input	roztok proteinů vstupující do precipitace
<i>flow through 1</i>	„odpad“ po precipitaci – to, co se nenavázalo na protein A sepharózu
1. promytí	„odpad“ po promývání matrice – slouží jako kontrola znečištění precipitátu náhodně ulpělými proteiny
2. promytí	„odpad“ po druhém promývání matrice – slouží jako kontrola, zda bylo první promývání od náhodně ulpělých proteinů dostatečné
eluát 1	precipitát oddělený od matrice po prvním 10min povaření
eluát 2	precipitát oddělený od matrice po druhém 10min povaření (obsahuje pouze to, co se od matrice při prvním povaření neoddělilo)
<i>flow through 2</i>	„odpad“ po opakované inkubaci „ <i>flow through 1</i> “ s novou protein A sepharózou
eluát 3	precipitát po opakované inkubaci „ <i>flow through 1</i> “ s novou protein A sepharózou oddělený povařením od matrice



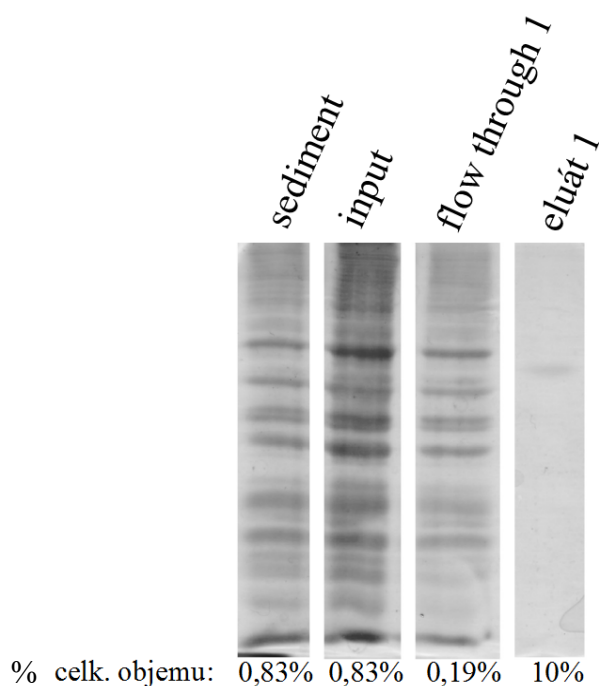
Obrázek 28: První pokus koimunoprecipitace proteinu Prp45 značeného epitopem 3HA a proteinu Prp46 značeného proteinem GFP. Precipitován byl protein Prp45 z proteinových extraktů dvojité značeného kmene, na nitrocelulózové membráně s rozdělenými precipitovanými proteiny byl detekován protein Prp46 protilátkou proti jeho značce GFP. Očekávaná velikost proteinu Prp46-GFP je 77,6 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 1.)

Použitá protilátka anti-GFP-AP (více viz kapitola 3.1.5) detekovala mnoho nespecifit, z dostupných protilátek při testování (neuváděno) však detekovala vlastní protein GFP

nejméně. Výskyt nespecifických signálů v tomto případě ale nebrání použití protilátky pro detekci značených proteinů v precipitátu (eluátu), kde se nespecifické signály již nevyskytují.

V prvním pokusu bylo zejména testováno, zda metoda funguje; toto bylo potvrzeno. Již dobře známá fyzická interakce proteinu Prp45 a Prp46 byla nalezena (obrázek 28, eluát). Signál nicméně nebyl dostatečně uspokojivý pro hledání interakcí slabých, bylo tedy nutné jeho zesílení. Opakované povaření matrice by zřejmě signál významně nezesílilo. Signál precipitátu (i „odpadního“ *flow through*) po opakované inkubaci lyzátu s protein A sepharózou však naznačoval, že optimalizací tohoto kroku by mohla být síla signálu upravena.

Pro sílu signálu je taktéž rozhodující, kolik proteinů vstupuje do precipitace. Při nedostatečně efektivním rozbíjení buněk se zbytečně ztrácí materiál. Přestože vizuálním odhadem koncentrace proteinů na polyakrylamidovém gelu (obrázek 29) se zdá, že v sedimentu po rozbíjení buněk ulpěla jen menšina proteinů a výrazně více proteinů bylo získáno pro precipitaci, je i toto krok, jehož optimalizací lze zvýšit výtěžek.

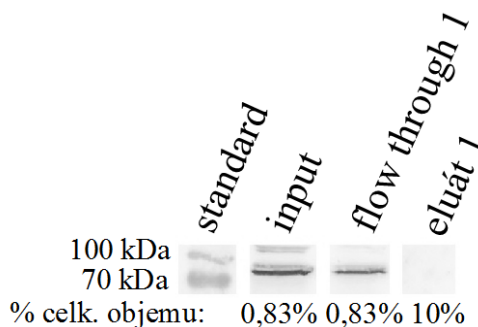


Obrázek 29: Proteiny kmene obsahujícího Prp46-GFP a Prp45-3HA rozdělené na 10% polyakrylamidovém gelu. Sediment, input a flow through obsahují všechny buněčné proteiny (flow through je částečně ochuzen o precipitované proteiny), eluát obsahuje už pouze proteiny precipitované spolu s proteinem Prp45.

Negativní kontrola pokusu (obrázek 30) ukázala, že detekovaný protein se neváže nespecificky na matrici a nekontaminuje precipitát. Signál získaný v precipitátu pozitivní

kontroly je tedy nezkraslený nespecifickým pozadím.

Stejně tak nepřítomnost signálu v pufru, kterým byla předtím sepharóza promývána (obrázek 28, 1., resp. 2. promytí), ukázala, že nespecifické vazby na matici nebudou problémem.



Obrázek 30: Negativní kontrola prvního pokusu, tedy koimunoprecipitace provedená s kmenem obsahujícím pouze značku GFP na proteinu Prp46. Precipitovány byly proteiny vázané na protilátku anti-HA a protein A sepharózu, na nitrocelulózové membráně s rozdělenými proteiny byla detekována značka GFP specifickou protilátkou. Protein Prp46-GFP (77,6 kDa) se vyskytoval v lyzátu před precipitací i v „odpadu“ po precipitaci, v samotném precipitátu již nikoliv. (Podkladový materiál viz příloha 2.)

Následně byly připraveny buňky dle protokolu (v kapitole 3.2.18), které byly před rozbíjením spočítány v počítací komůrce. Bylo napočítáno přibližně  $10^{10}$  buněk na 1 ml. Následně byly buňky rozbity dle protokolu (v kapitole 3.2.18) a znovu spočítány v počítací komůrce. Bylo napočítáno méně než  $10^9$  buněk na ml. Rozbilo se tedy asi 90 % buněk. Rozbíjení buněk tudíž nebylo potřeba optimalizovat.

Dále byl testován efekt různě dlouhé inkubace směsi proteinového lyzátu a protilátky anti-HA s protein A sepharózou. Buňky kmene obsahujícího Prp46-GFP a Prp45-3HA byly ošetřeny dle protokolu (v kapitole 3.2.18), následná práce s lyzátem taktéž probíhala dle protokolu (3.2.21) s následujícími modifikacemi:

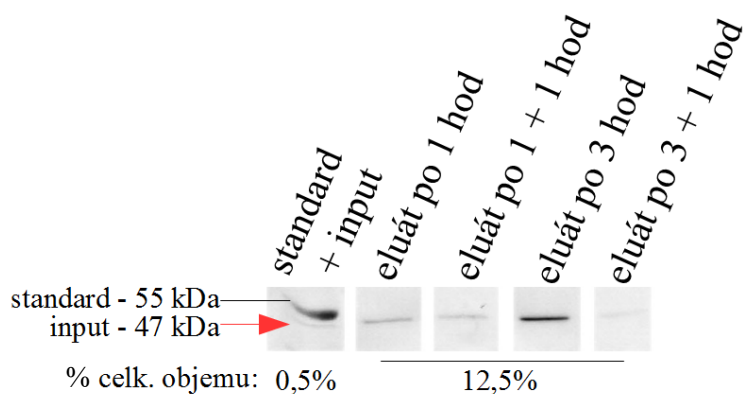
- Lyzát byl inkubován s protilátkou anti-HA 3 hod ve 4 °C.
- S protein A sepharózou byl následně lyzát inkubován 1 hod nebo 3 hod ve 4 °C.
- Lyzát po inkubaci se sepharózou (který se jindy stane odpadem) byl přidán k nové protein A sepharóze a znovu inkubován 1 hod ve 4 °C.

Zajímala nás zejména efektivita vazby Prp45-3HA na matici, detekována byla proto přímo značka 3HA (obrázek 31). K detekci byla použita protilátka anti-HA-AP (více viz kapitola 3.1.5), tedy jiná, než byla použita pro purifikaci. Detekce protilátkou HA.11 byla

taktéž vyzkoušena (neuváděno), ta ale velmi silně rozpoznávala své vlastní lehké a těžké řetězce, přičemž těžký řetězec v oblasti 50 kDa překrýval signál Prp45-3HA.

Testována byla i délka inkubace lyzátu s protein A sepharózou 16 hod a také opakovaná inkubace *flow through* po těchto 16 hod s novou protein A sepharózou po dobu další 1 hod (neuváděno), z neznámého důvodu byl ale výsledný signál Prp45-3HA slabší než po 3 hodinové inkubaci. Důvodem mohla být degradace proteinů ve vzorku proteázami následkem dlouhé inkubace, ale také metodická chyba. Výsledek proto nebyl zařazen.

Obrázek 31 zřetelně vypovídá, že 3 hodinovou inkubací lyzátu s protein A sepharózou získáme výrazně vyšší množství precipitovaného proteinu než po 1 hodině. Během vlastního testování interakcí byla inkubace lyzátu dále upravena na 2 hodiny s protilátkou a 4 hodiny s protein A sepharózou, což u pozitivní kontroly vedlo k srovnatelnému výsledku.



Obrázek 31: Optimalizace délky inkubace proteinového extraktu s protein A sepharózou. Proteiny rozdělené na polyakrylamidovém gelu a přenesené na nitrocelulózovou membránu byly detekovány specifickou protilátkou proti značce HA (jinou, než která byla použita pro purifikaci); bylo tak pozorováno množství proteinu Prp45 vyvázaného na matici v různých časových úsecích. Sloupce nazvané eluát 1 + 1 hod resp. 3 + 1 hod označují precipitát po opakované inkubaci *flow through* s protein A sepharózou, a to po dobu 1 hodiny. Poprvé byl lyzát s protein A sepharózou inkubován 1 resp. 3 hod. Očekávaná délka Prp45-3HA byla 47 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 3.)

## 5.2.2 Precipitace za značku GST a následná detekce značky TAP

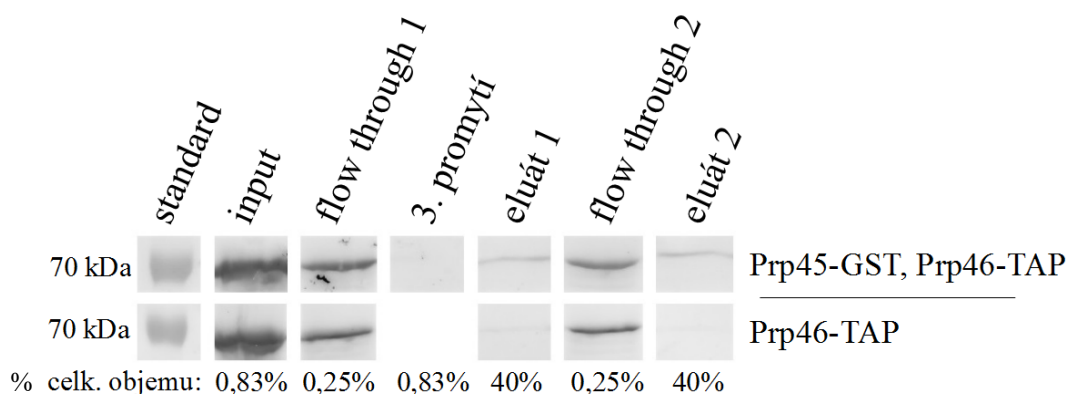
Princip této metody je obdobný jako princip koimunoprecipitace značky HA a následné detekce značky GFP (obrázek 27). Na rozdíl od koimunoprecipitace ale v tomto případě není potřebná pro vyvazování proteinu Prp45 protilátka, značka GST se váže přímo

na glutathion agarózu. To umožňuje provádět metodu ve vyšším objemu tak, abychom ve výsledném eluátu získali více vyprecipitovaného proteinu a spolu s ním i větší množství jeho interakčního partnera. Podrobný postup této metody je uveden v kapitole 3.2.22. Příprava buněčného lyzátu a imunodetekce proteinů v precipitátu probíhaly stejně jako u předchozí metody (viz kapitoly 3.2.18, 3.2.19, 3.2.20, 3.2.23, 3.2.24 a 3.2.25).

První pokus byl proveden s pozitivní (Prp45-GST, Prp46-TAP) a negativní kontrolou (Prp46-TAP), a to dle protokolu s jedinou modifikací:

- Lyzát po inkubaci s glutathion agarózou (který se jindy stane odpadem) byl přidán k nové glutathion agaróze a znovu inkubován 1 hod ve 4 °C.

Signál interakčního partnera byl sice získán (obrázek 32, eluát 1 a eluát 2 nahoře), byl ale velmi slabý (oproti signálu po koimunoprecipitaci, obrázek 28) a navíc zřejmě znečištěn falešně pozitivním pozadím, jak napovídá i náznak signálu v precipitátu negativní kontroly (obrázek 32, eluát 1 a eluát 2 dole). Jednalo se pravděpodobně o „přetečení“ vzorků z jamek na polyakrylamidovém gelu (jak napovídá i ne úplně čistý sloupec 3. promytí – obrázek 32) – na gel bylo totiž nanášeno co největší množství proteinů pro dosažení vyššího signálu, jamky byly plněny až po okraj a jednotlivé vzorky byly v jamkách vedle sebe. Pro předejití tomuto problému byly napříště precipitáty nanášeny do jamek oddělených od ostatních vzorků prázdnými jamkami.



Obrázek 32: První pokus purifikace GST a následné detekce TAP. Purifikovány byly proteinové extrakty obsahující proteiny Prp45-GST, Prp46-TAP (nahore) a nebo jen Prp46-TAP (dole). Proteiny byly rozděleny na 7% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu, kde byla detekována značka TAP pomocí specifické protilátky. Sloupce nazvané eluát 2 a flow through 2 označují eluát resp. flow through po opakované inkubaci flow through 1 s glutathion agarózou. Očekávaná velikost detekovaného proteinu Prp46-TAP byla 71 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 4.)

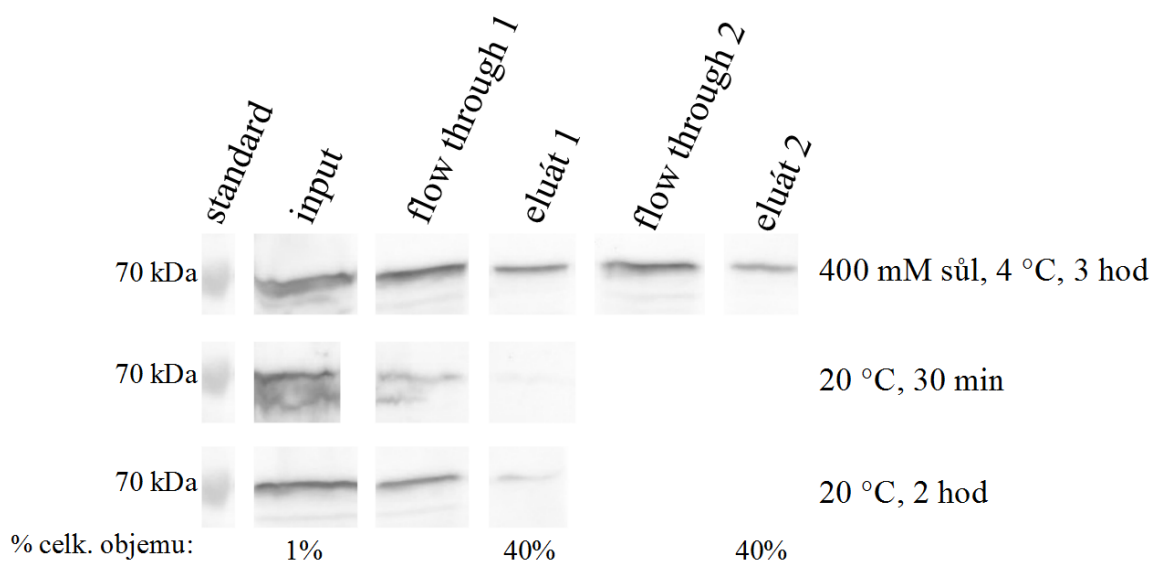
Kromě úpravy délky inkubace s glutathion agarózou a inkubační teploty se nabízelo pro zvýšení efektivity vazby na matrici změnit iontové podmínky v roztoku zvýšením koncentrace soli pro zlepšení solubility proteinů. Optimalizace byla prováděna s klasicky připraveným proteinovým extraktem (viz kapitola 3.2.18) obsahujícím proteiny Prp45-GST a Prp46-TAP.

Jeden ze vzorků byl následně precipitován dle protokolu (viz kapitola 3.2.22), použitý lyzační pufr ale obsahoval navíc ještě 250 mM KCl. Celková koncentrace soli v pufru byla tedy 400 mM. Po inkubaci byl lyzát znovu použit k inkubaci s novou glutathion agarózou po dobu 1 hod.

Druhý a třetí vzorek byly precipitovány ve standardním lyzačním pufru, od původního protokolu se ale jejich zpracování lišilo teplotou při inkubaci s matricí (30 °C) a délkou inkubace (30 min resp. 2 hod).

Výsledek ukazuje obrázek 33. Zvýšení koncentrace soli v lyzátu mělo za následek výrazné zvýšení množství hledaného interakčního partnera v precipitátu (obrázek 33 nahoře, eluát). Naopak inkubace ve 20 °C se neukázala jako vhodná, signál interakčního partnera v precipitátu (obrázek 33 dole a uprostřed, eluát) byl ještě slabší než za standardních podmínek (obrázek 32 nahoře, eluát). Vysokou teplotou jsou aktivovány proteázy, ty tak mohly být příčinou snížení množství precipitovaného proteinu či jeho interakčního partnera (či obou) v precipitátu.





Obrázek 33: Optimalizace purifikace GST a následné detekce TAP. Purifikovány byly proteinové extrakty obsahující proteiny Prp45-GST a Prp46-TAP. Měněno bylo složení lyzačního pufru (400 mM sůl) a podmínky inkubace s matricí (teplota a čas). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu. Následně byla detekována značka TAP specifickou protilátkou. Sloupce eluát 2 a flow through 2 označují eluát resp. flow through po opakované inkubaci flow through 1 s matricí. Na gel bylo nanášeno 0,28 %, 0,21 % a 0,20 % celkového objemu flow through 1 vzorků se 40 mM solí, po 30 min inkubace ve 20 °C, resp. po 2 hod inkubace ve 20 °C. Celkového objemu flow through 2 bylo u všech vzorků nanášeno 0,28 %. Očekávaná velikost detekovaného proteinu Prp46-TAP byla 71 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 5.)

Další z variant optimalizace, ke které bylo následně přistoupeno, byla digestce připraveného proteinového extraktu nukleázami za účelem zbavení se velkých DNA-proteinových komplexů, které mohou fyzicky bránit vazbě proteinu na matrici.

Nejprve byla vyzkoušena MNáza (mikrokokální nukleáza), která štěpí nespecificky jednovláknovou i dvojitou vláknovou DNA i RNA, a to uvnitř i na koncích řetězce. Pro vyzkoušení její účinnosti bylo testováno její štěpení *salmon sperm* DNA v různých koncentracích a časech ve 20 °C (obrázek 34).

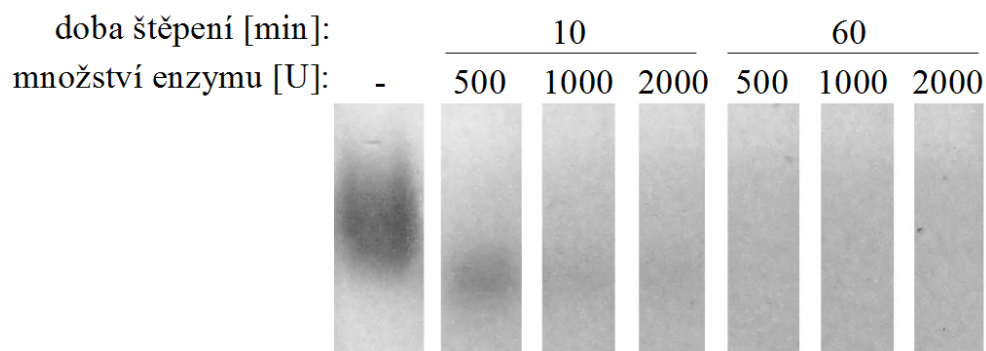
Do 100 µl lyzačního pufru (bez EDTA) (viz kapitola 3.2.18) bylo přidáno:

1 mg/ml *salmon sperm* DNA

1 mM  $\text{CaCl}_2$

K reakční směsi bylo následně přidáno 500, 1000 nebo 2000 U MNázy.

Štěpení bylo po 10 nebo 60 min zastaveno přidáním 50 mM EDTA.



*Obrázek 34: Testování účinnosti štěpení DNA MNázou. Na agarózovém gelu byla rozdělena salmon sperm DNA po různě dlouhé expozici různému množství enzymu ve 20 °C. Po 60 minutách inkubace s enzymem již nebyla neštěpená DNA na gelu viditelná bez ohledu na použité ředění enzymu.*

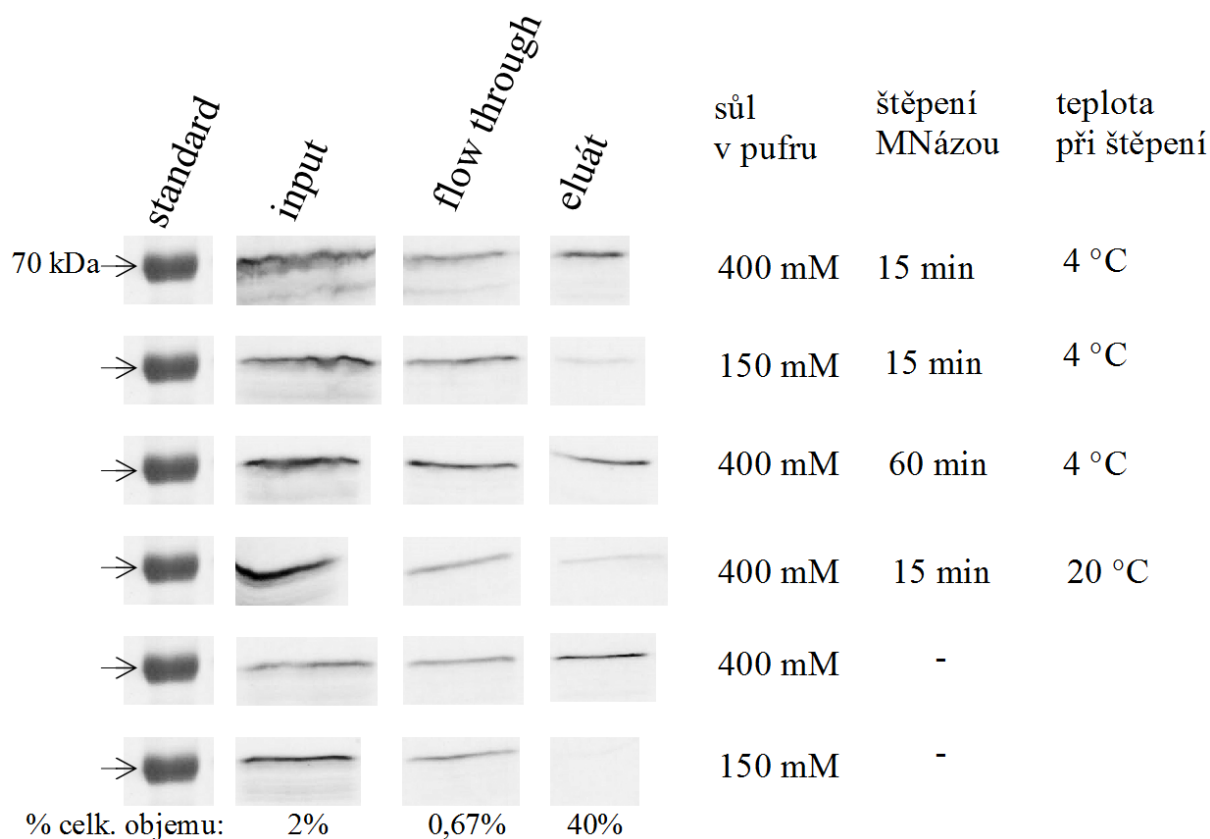
Protože MNáza štěpila DNA velmi účinně, byla její koncentrace při štěpení lyzátů před precipitací zvolena na 2000 U/ml ve vzorku obsahujícím proteiny v koncentraci 5 mg/ml.

Vzorky pro precipitaci byly připraveny standardním způsobem v lyzačním pufru obsahujícím buď 150 mM nebo 400 mM sůl a neobsahujícím EDTA (inhibuje aktivitu MNázy). Po naředění proteinů na 5 mg/ml byl k některým vzorkům přidán 1 mM  $\text{CaCl}_2$  a MNáza.

Protože aktivita MNázy je závislá na iontech  $\text{Ca}^{2+}$  a je vyšší při teplotě 20 °C, což jsou podmínky, které podporují aktivaci proteáz ve vzorku, bylo nutné najít kompromis mezi důkladným štěpením DNA a intaktností vzorků. DNA ve vzorcích byla proto naštěpena buď mírně (15 min, 4 °C), nebo důkladně po delší dobu (60 min, 4 °C), a nebo krátce za lepších podmínek pro štěpení (15 min, 20 °C).

Štěpení bylo následně zastaveno přidáním 50 mM EDTA – ta byla přidána i do vzorků, které s MNázou inkubovány nebyly. Dále byly vzorky již standardně inkubovány s glutathion agarózou 3 hod ve 4 °C.

Výsledek tohoto pokusu je na obrázku 35. Porovnáme-li precipitáty vzorků, v jejichž pufru byla přítomna 400 mM sůl, pak doznáme, že štěpení MNázou nemělo uspokojivý efekt. Inkubace ve 20 °C se dokonce na výsledném signálu projevila negativně. Výraznější signál v precipitátu nebyl získán ani u vzorku, jenž byl zpracováván ve 150 mM soli a štěpen.



Obrázek 35: Optimalizace purifikace GST a následné detekce TAP. Purifikovány byly proteinové extrakty obsahující proteiny Prp45-GST a Prp46-TAP. Měněno bylo složení lyzačního pufru (400 mM sůl) a podmínky štěpení MNázou (teplota a čas). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu. Na té byla posléze detekována značka TAP pomocí specifické protilátky. Očekávaná velikost detekovaného proteinu Prp46-TAP byla 71 kDa. Šipka označuje velikost odpovídající 70 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 6.)

Štěpení MNázou tedy lepší výsledek nepřineslo.

Pro efektivní precipitaci značky GST existují i komerční sady - například *BugBuster<sup>®</sup> GST•Bind Purification Kit*, který je určen pro purifikaci proteinů z *E. coli*. Z této sady byl použit pufr *BugBuster Protein Extraction Reagent* a enzym benzonáza (*Benzonase<sup>®</sup> Nuclease*, více viz kapitola 3.1.4).

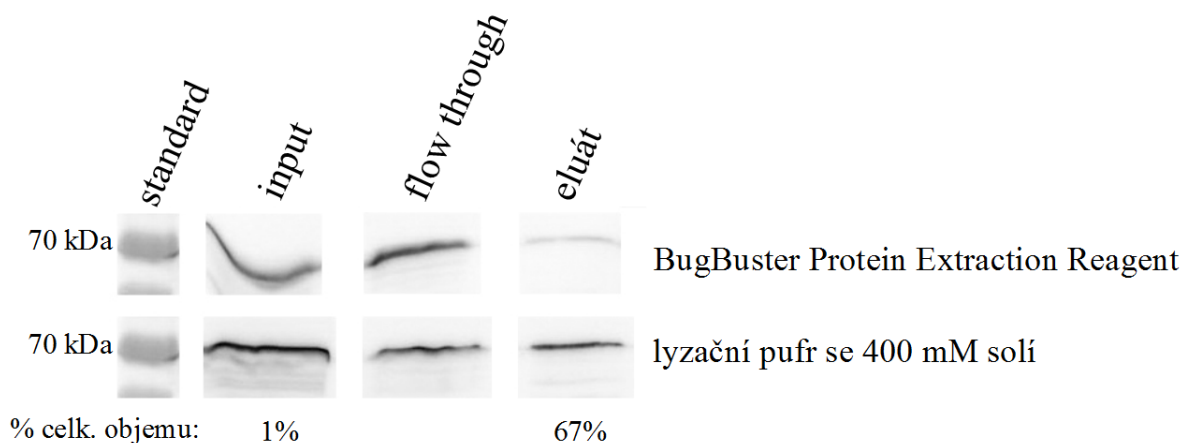
Benzonáza je endonukleáza, která štěpí všechny typy DNA i RNA na krátké oligonukleotidy. Nemá být inaktivována detergenty, EDTA (1mM) ani proteázovými inhibitory, je ale inaktivována monovalentními kationty o koncentracích vyšších než 50 mM (informace od výrobce).

Pufr z této komerční sady je určen pro lyzi bakteriálních buněk bez mechanického zásahu – kvasinkové buňky ale tak ochotně nelyzují. Kvasinkové kultury byly proto nejdříve

připravovány klasicky dle protokolu v 3.2.18, ale v lyzačním pufru 3x naředěném tak, aby výsledná koncentrace NaCl v roztoku byla 50 mM (vyšší koncentrace by snižovala aktivitu benzonázy). Před homogenizací byl k buňkám přidán pufr *BugBuster Protein Extraction Reagent* (obohacený o inhibitory proteáz a detergent stejně koncentrované jako ve standardním lyzačním pufru) a po homogenizaci a odstranění skleněných kuliček byla k proteinovému lyzátu přidána benzonáza o koncentraci asi 25 U/ml (dle doporučení výrobce), vzorek s ní byl inkubován 15 minut na „kolotoči“ v laboratorní teplotě (dle doporučení výrobce). Poté byl lyzát centrifugován (16000 g, 20 min, 4 °C), pelet byl odstraněn a dále bylo kvantifikováno množství proteinů v lyzátu dle protokolu (3.2.19 nebo 3.2.20) a následně byla provedena standardně precipitace (viz kapitola 3.2.22).

Současně byl standardně zpracováván vzorek v lyzačním pufru se 400 mM solí, ke kterému byla po homogenizaci a odstranění skleněných kuliček přidána benzonáza o koncentraci asi 25 U/ml, vzorek s ní byl inkubován 15 minut na „kolotoči“ v laboratorní teplotě. Poté byl lyzát taktéž centrifugován (16000 g, 20 min, 4 °C), pelet byl odstraněn, další postup byl standardní dle protokolů (3.2.19 nebo 3.2.20 a 3.2.22), ale v *BugBuster Protein Extraction Reagent* místo lyzačního pufru. Značka TAP byla v precipitátech obou vzorků standardně detekována dle protokolů (3.2.23, 3.2.24 a 3.2.25). Výsledek je na obrázku 36.

Zpracování buněk v pufru *BugBuster Protein Extraction Reagent* nevedlo k lepšímu výsledku než stejný postup ve standardním lyzačním pufru. Již v extraktu vstupujícím do precipitace byla asi o polovinu nižší koncentrace proteinů než obvykle bývá v lyzátech zpracovaných v lyzačním pufru. To bylo pravděpodobně i příčinou nižšího výstupního signálu v precipitátu. Precipitát standardně zpracovaného vzorku v lyzačním pufru se 400 mM solí a naštěpeného benzonázou naproti tomu obsahoval soudě dle síly signálu detekované značky TAP poměrně hodně proteinu Prp46.



Obrázek 36: Purifikace GST z proteinových extraktů štěpených benzonázou a následná detekce TAP. Purifikovány byly proteinové extrakty obsahující proteiny Prp45-GST a Prp46-TAP. Příprava proteinového lyzátu a precipitace byla prováděna dle protokolu, ale v 3x ředěném lyzačním pufru a po homogenizaci v BugBuster Protein Extraction Reagent (nahore) nebo po celou dobu v lyzačním pufru se 400 mM solí (dole). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu, kde byla posléze detekována specifickou protilátkou značka TAP. Na gel bylo nanášeno 0,44 % a 0,28 % celkového objemu flow through vzorku v pufru BugBuster resp. vzorku v lyzačním pufru. Očekávaná velikost detekovaného proteinu Prp46-TAP byla 71 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 7.)

Kromě snahy o zesílení signálu a odhalení i méně četných interakcí je možné se zaměřit i na interakce, které jsou tranzientní, tedy existují pouze v určitém okamžiku. Tyto interakce by nemusely být odhaleny, ať by byla efektivita precipitace sebelepší, poněvadž by pravděpodobně nebyly zachovány po lyzi buněk. K hledání takovýchto interakcí byla zavedena metoda (Hall a Struhl, 2002), ve které jsou DNA a proteiny nacházející se blízko sebe v buňkách po kultivaci chemicky fixovány („zesíťování“, *crosslink*). Tím je zakonzervován v podstatě nativní stav interakcí v buňce. Problémem této metody je, že k sobě mohou být zafixovány i proteiny, které se vyskytují v těsné blízkosti od sebe, aniž by spolu fyzicky interagovaly. Metoda tak může přinést i falešně pozitivní výsledek.

Byla tedy vyzkoušena metoda umožňující i hledání tranzientních interakcí. Nejdříve byly proteiny a DNA fixovány bez následné fragmentace DNA.

Protokol přípravy proteinových extraktů z kvasinek pro precipitaci (viz kapitola 3.2.18) byl modifikován následovně (upraveno dle Hall a Struhl, 2002):

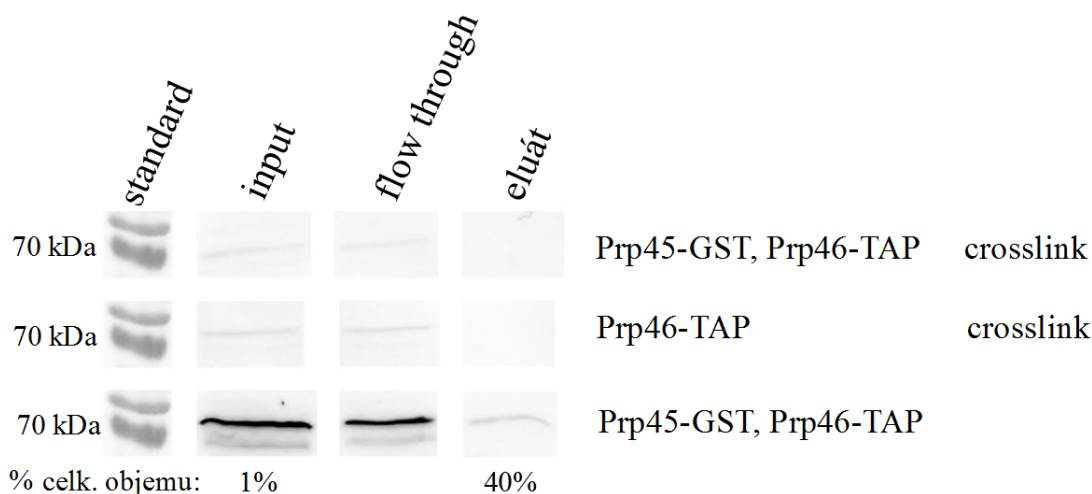
- Kvasinkové kultury (200 ml), které dosáhly  $OD_{595}$  cca 0,8, byly inkubovány 30 min na třepačce ve 25 °C s 1% formaldehydem (v/v).
- Fixace byla poté zastavena přidáním 0,125M glycinu, se kterým byla kultura dále

inkubována 10 min ve 25 °C na třepačce.

- Dále byly kultury zpracovány standardním způsobem, centrifugace ale probíhaly v laboratorní teplotě.

Následovalo měření koncentrace (3.2.19 nebo 3.2.20) a purifikace značky GST dle protokolu (viz kapitola 3.2.22), po rozbíjení byly ale lyzáty zpracovávány v lyzačním pufru se 400 mM solí. Detekce značky TAP byla prováděna dle 3.2.23, 3.2.24 a 3.2.25.

Výsledek precipitace značky GST z buněk s fixovanými proteiny je na obrázku 37. Signál značky TAP v precipitátu po fixaci nebyl získán ani u pozitivní kontroly (obrázek 37 nahoře, eluát). Většinový podíl na absenci signálu v precipitátu měl zřejmě fakt, že již v inputu s fixovanými proteiny byla asi 3x nižší koncentrace proteinů než obvykle. Lze tedy předpokládat, že vytvořené komplexy proteinů a DNA se kvůli svojí velikosti během centrifugace po rozbíjení usadily na dně spolu se zbytky buněk, a nestaly se tak součástí lyzátu vstupujícího do precipitace.

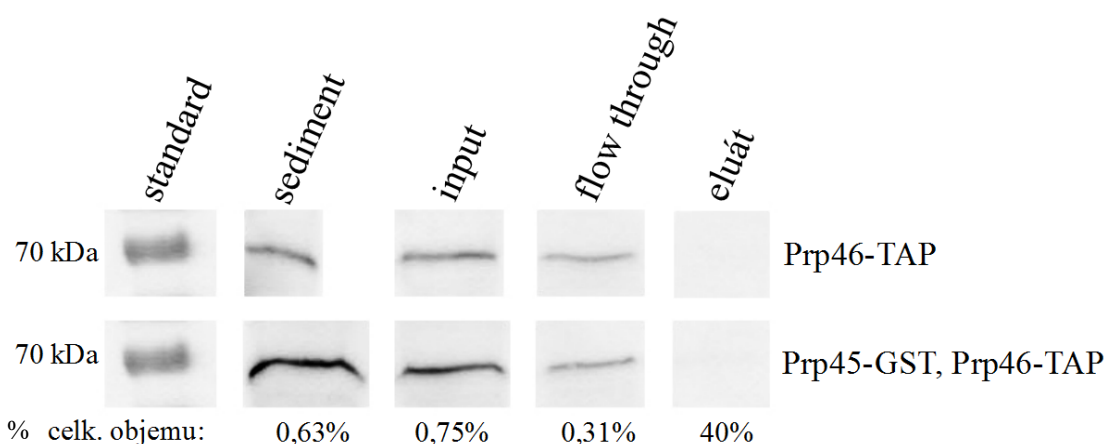


Obrázek 37: Purifikace GST z lyzátní se „zesítěvanými“ proteiny a následná detekce TAP. Purifikovány byly proteinové extrakty obsahující proteiny Prp45-GST a Prp46-TAP (nahore) nebo jenom Prp46-TAP (uprostřed). Současně byl zpracováván extrakt obsahující Prp45-GST a Prp46-TAP bez „zesítěvání“ (dole). Precipitace byla prováděna dle protokolu v lyzačním pufru se 400 mM solí. Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu, kde byla hledána značka TAP pomocí specifické protilátky. Na gel bylo nanášeno 1 % a 0,39 % celkového objemu flow through vzorků s fixovanými proteiny resp. standardně připraveného vzorku. Očekávaná velikost detekovaného proteinu Prp46-TAP byla 71 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 8.)

Po fixaci buněk a homogenizaci byl tedy zařazen další krok postupu, a to štěpení DNA na 200-800 bp dlouhé fragmenty pomocí sonikace (upraveno dle Hall a Struhl, 2002):

- Po homogenizaci byly buňky resuspendovány v lyzačním pufru se 400mM solí a sonikovány ve vodní lázni ve 2 °C (program 15 x 30 s on, 15 x 30 s off; sonikováno bylo vždy 6 zkumavek po 300 µl vzorku nebo H<sub>2</sub>O), poté centrifugovány (20000 g, 10 min, 4 °C).
- Další postup byl standardní v lyzačním pufru se 400mM solí.

Koncentrace proteinů v takto zpracovaných lyzátech před precipitací byla již podobná jako ve standardně zpracovávaných lyzátech, do precipitace tedy vstupovalo dostatečné množství proteinů. Výsledek purifikace značky GST z fixovaných a sonikovaných vzorků je na obrázku 38. V precipitátu (eluát) se ani v tomto případě neobjevil u pozitivní kontroly (dole) žádný signál.



*Obrázek 38: Purifikace GST z lyzátů po „zesíťování“ proteinů a následné sonikaci a následná detekce TAP. Purifikovány byly proteinové extrakty obsahující proteiny Prp45-GST a Prp46-TAP (dole) nebo jenom Prp46-TAP (nahore). Precipitace byla prováděna dle protokolu v lyzačním pufru se 400 mM solí. Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Na ní byla posléze specifickou protilátkou detekována značka TAP. Očekávaná velikost detekovaného proteinu Prp46-TAP byla 71 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 9.)*

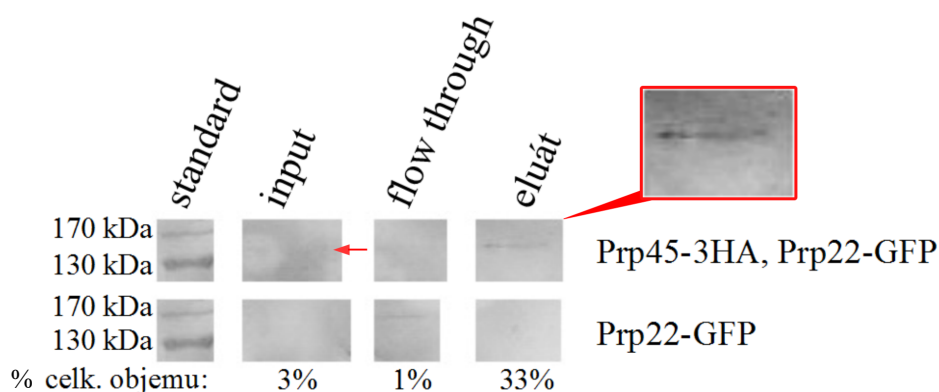
Protože fixace komplexů DNA a proteinů ani v případě, že DNA byla následně fragmentována sonikací, nevedla k pozitivnímu výsledku ani u pozitivní kontroly jinak fungující metody, bylo od tohoto záměru upuštěno.

Fyzické interakce proteinu Prp45 byly tedy testovány bez „zesíťování“ proteinů. Příprava buněk probíhala dle 3.2.18 a purifikace dle 3.2.22 s tím rozdílem, že buňky po homogenizaci byly zpracovávány v lyzačním pufru se 400 mM solí a inkubovány 15 minut s benzonázou (25 U/ml) na „kolotoči“ v laboratorní teplotě.

## 5.3 Testování interakce proteinu Prp22 s proteinem

### Prp45

Fyzická interakce proteinu Prp45 s další komponentou sestřihového komplexu, proteinem Prp22, nebyla dříve pozorována přímou koimunoprecipitací těchto dvou proteinů. Byl ale prokázán přímý vliv Prp45 na vazbu Prp22 na spliceosom. Předpokládá se, že jde o příklad slabé vazby (Gahura *et al.*, 2009). Navíc byla tato vazba pokázána také nepřímo v dvouhybridním systému (Albers *et al.*, 2003). Tato vazba byla přímo prokázána i zde imunoprecipitací proteinu Prp45-3HA a následnou imunodetekcí proteinu Prp22-GFP (obrázek 39). Úspěšně detekovaná značka na Prp22 v precipitátu proteinu Prp45 (obrázek 39 nahoře, eluát) kromě toho dokazuje, že touto optimalizovanou metodou lze najít i slabé interakce.



Obrázek 39: Výsledek testování interakce proteinu Prp22 s proteinem Prp45 koimunoprecipitací. Precipitován byl protein Prp45-3HA z proteinových extraktů kvasinkových kmenů obsahujících Prp45-3HA a Prp22-GFP (nahoře) nebo jen Prp22-GFP (dole). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu, metodou western blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu a zde byl posléze detekován protein Prp22-GFP specifickou protilátkou. Očekávaná velikost fúzního proteinu Prp22-GFP byla 157 kDa (oblast označená šipkou). (Podkladový materiál viz příloha 10.)



## 5.4 Testování interakcí proteinů Ada2, Ahc1, Yta7, Ngg1, Eaf3 a Vps75 s proteinem Prp45

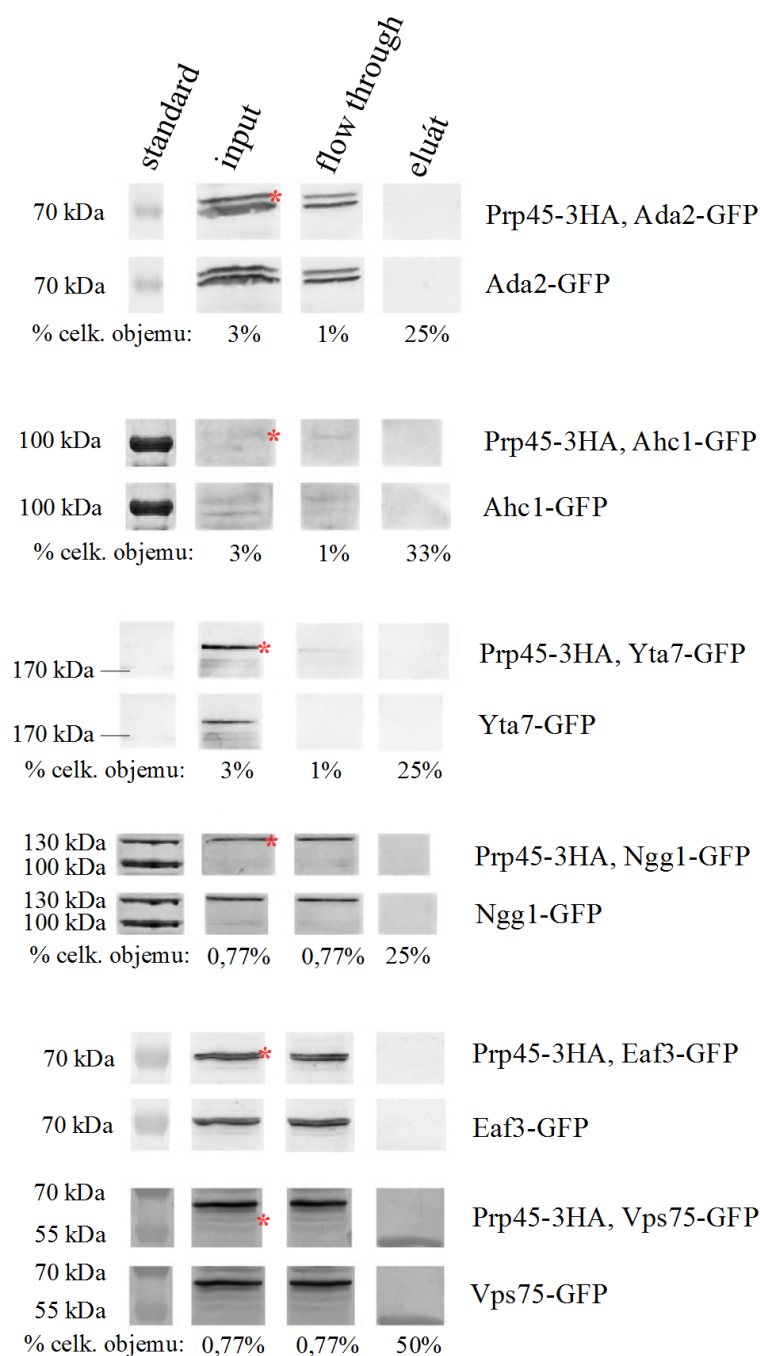
Optimalizovanými koprecipitačními metodami byly hledány interakce proteinu Prp45 s proteiny účastnícími se regulace transkripce za použití připravených kmenů.

Koimunoprecipitace proteinu Prp45-3HA a proteinu Ada2, Ahc1, Yta7, Ngg1, Eaf3 nebo Vps75 značeného GFP<sup>5</sup> neodhalila žádnou pozitivní interakci (obrázek 40). V proteinových extraktech vstupujících do precipitace přitom proteiny značené GFP přítomny byly (obrázek 40, sloupec input), i když v případě Ahc1-GFP a Vps75-GFP byl signál těchto proteinů v inputu pravděpodobně příliš slabý pro jejich nalezení v precipitátu proteinu Prp45.

Ani koprecipitace proteinu Prp45-GST a proteinu Ada2, Ahc1, Yta7 nebo Ngg1 značeného TAP žádnou fyzickou interakci odhalující fyzické spojení sestřihu a transkripce neodhalila (obrázek 41). Ve všech proteinových extraktech vstupujících do koprecipitace přitom bylo přítomno velké množství proteinu značeného TAP (obrázek 41, input), které by jistě umožňovalo i odhalení slabší interakce v precipitátu.

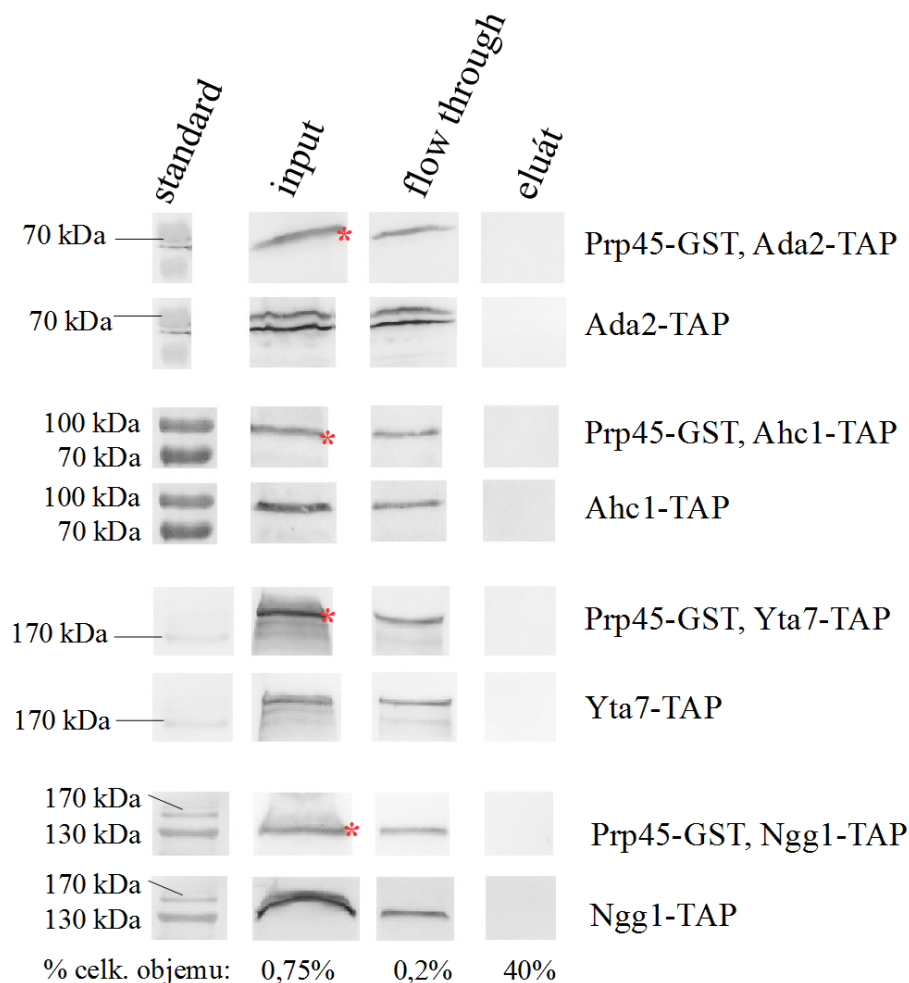
---

5 Testování interakcí proteinu Prp45 s Ngg1, Eaf3 a Vps75 koimunoprecipitací prováděla K. Abrhánová.



Obrázek 40: Výsledek testování interakcí proteinů Ada2, Ahc1, Yta7, Ngg1, Eaf3 a Vps75 s proteinem Prp45 koimunoprecipitací. Precipitován byl protein Prp45-3HA z proteinových extraktů kmenů obsahujících Prp45-3HA a jeden z výše uvedených proteinů značený GFP (liché řádky) nebo pouze protein značený GFP (sudé řádky). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a přeneseny na membránu, kde byla značka GFP detekována specifickou protilátkou. Proteinové extrakty neobsahující Prp45-3HA sloužily jako negativní kontrola ke každé hledané interakci. (Podkladový materiál viz příloha 11.)

Očekávané velikosti detekovaných fúzních proteinů (oblasti označené hvězdičkou):  
 Ada2-GFP - 77 kDa  
 Ahc1-GFP - 90 kDa  
 Yta7-GFP - 184 kDa  
 Ngg1-GFP - 106 kDa (dle výsledku ověřování kmenů ale asi o 30 kDa více)  
 Eaf3-GFP - 72 kDa  
 Vps75-GFP - 58 kDa



Obrázek 41: Výsledek testování interakcí proteinů *Ada2*, *Ahc1*, *Yta7* a *Ngg1* s proteinem *Prp45* koprecipitací. Precipitován byl protein *Prp45*-GST z proteinových extraktů kvasinkových kmenů obsahujících *Prp45*-GST a jeden z výše uvedených proteinů značený TAP (liché řádky) nebo pouze protein značený TAP (sudé řádky). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu, následně byly metodou western blot přeneseny na membránu. Specifickou protilátkou zde byla následně detekována značka TAP. Proteinové extrakty bez *Prp45*-GST sloužily jako negativní kontrola pro každou hledanou interakci. Očekávané velikosti detekovaných fúzních proteinů (oblasti označené hvězdičkou):

*Ada2*-TAP - 71 kDa

*Ahc1*-TAP - 84 kDa

*Yta7*-TAP - 178 kDa

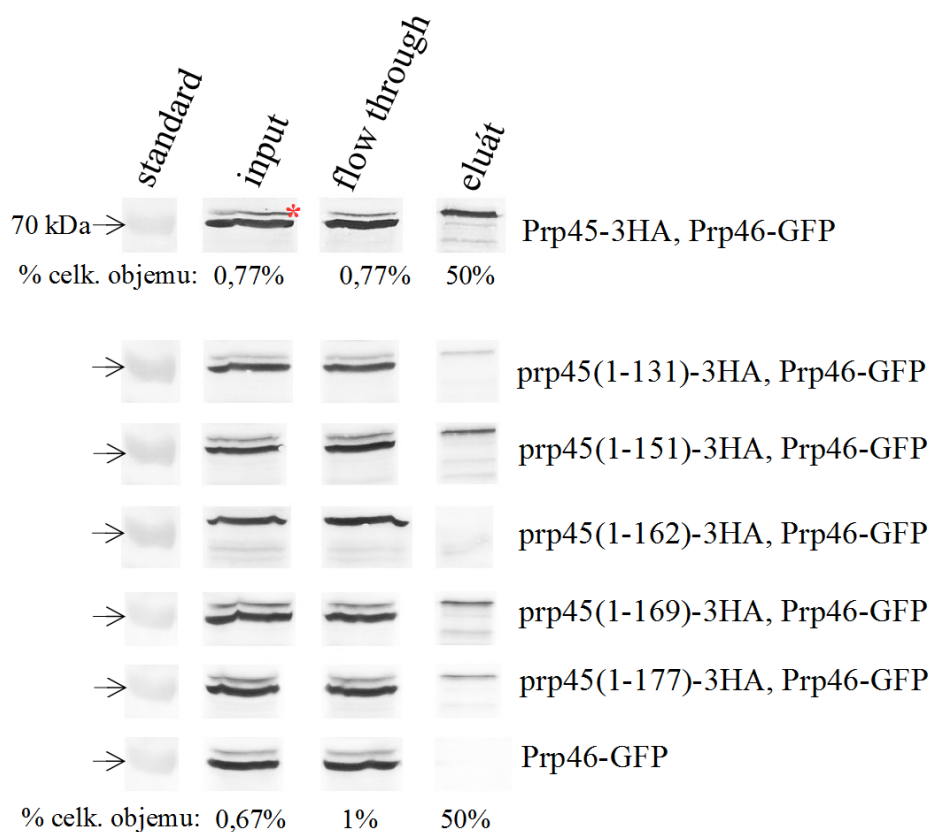
*Ngg1*-TAP - 100 kDa (dle výsledku ověřování kmenů ale přibližně o 30 kDa více)

(Podkladový materiál viz příloha 12.)

## 5.5 Testování interakcí proteinu Prp46 se zkrácenými variantami proteinu Prp45

Nakonec byla blíže charakterizována interakce proteinů Prp46 a Prp45 hledáním interakcí proteinu Prp46 s různě zkrácenými variantami proteinu Prp45. Koimunoprecipitací těchto variant značených 3HA a Prp46-GFP byly nalezeny interakce Prp46 s některými variantami Prp45 (obrázek 42, eluáty).

Z výsledku vyplývá, že protein Prp46 interaguje i s nejkratšími fragmenty Prp45, ale podstatně slaběji než s celým proteinem.



Obrázek 42: Výsledek testování interakcí proteinu Prp46 se zkrácenými variantami proteinu Prp45 koimunoprecipitací. Precipitovány byly fragmenty proteinu Prp45 značené 3HA z proteinových extraktů kvasinkových kmenů obsahujících Prp46-GFP a fragment proteinu Prp45 značený 3HA nebo pouze protein Prp46-GFP (dole). Proteiny byly rozděleny na 10% polyakrylamidovém gelu a metodou western blot přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Značka GFP zde byla posléze rozpoznávána specifickou protilátkou. Proteinové extrakty neobsahující žádný protein značený 3HA byly použity jako negativní kontrola. Očekávaná velikost detekovaného fúzního proteinu Prp46-GFP byla 77 kDa (oblast označená hvězdičkou). Šipky vyznačují oblast odpovídající 70 kDa. (Podkladový materiál viz příloha 13.)

## 6 Diskuze

V této práci byly testovány interakce proteinu Prp45 zejména v závislosti na kotranskripčně probíhajících procesech, ale také v rámci sestřihového komplexu, a to dvěma koprecipitačními metodami.

### 6.1 Metoda hledání fyzických interakcí

Koprecipitace je metoda, která poskytuje přímý důkaz fyzické interakce dvou proteinů. Jeden protein je precipitován z proteinového extraktu zachycením na matici a odstraněním všech nenavázaných proteinů. Druhý protein je posléze detekován v tomto precipitátu.

V této práci byla používána metoda koimunoprecipitace, kdy byl protein obsahující epitop 3HA navázan na protilátku anti-HA a vzniklý komplex byl posléze zachycen na protein A sepharózu. Byl tak získán precipitát, ve kterém byl detekován jiný protein pomocí specifické protilátky. Tato metoda se oproti ostatním proteinovým purifikačním metodám vyznačuje možností dobře kontrolovat úroveň nespecifické precipitace na matici. Výstupem ale bývá zároveň také nízký výtěžek.

Dalším přístupem použitým v této práci byla precipitace proteinu našeho zájmu fúzovaného s proteinem GST na glutathion agarózu. V získaném precipitátu je opět následně hledán jiný protein pomocí specifické protilátky. Tento přístup je nazýván afinitní purifikace, neboť protein GST se specificky váže na glutathion. Oproti koimunoprecipitaci tato metoda postrádá jeden krok (vazbu antigenu na protilátku). Díky tomu umožňuje získat vyšší výtěžek a nalezení slabších interakcí.

Oba přístupy disponují zásadní výhodou - proteinové extrakty jsou zpracovávány v šetrných nedenaturujících podmínkách a do struktury nebo množství jednotlivých proteinů není nijak zasahováno, což má zásadní vliv na následnou interpretaci výsledků: Díky tomu, že interakce jsou hledány v kompletním proteinovém extraktu obsahujícím všechny buněčné proteiny, které potenciálně mohou kompetovat o vazbu, je výsledek sám sobě i kontrolou specifity. K věrohodnosti výsledku přispívá i zachování takového poměru množství všech proteinů v lyzátu, jaký byl v živé buňce. V buněčném lyzátu pro precipitaci navíc máme již vytvořeny všechny proteinové komplexy, není proto potřeba znovu sestavovat komplexy

*in vitro*. Problémem není ani nalezení interakce vyžadující určité posttranslační modifikace díky tomu, že proteiny jsou precipitovány v nativním stavu (Phizicky a Fields, 1995).

I těmito metodami však lze získat nepravdivé výsledky. Častěji jde o falešná negativa, velkým problémem mohou ale být i falešná pozitiva.

Nejpravděpodobnější příčinou nalezení fyzické interakce, která ve skutečnosti neexistuje, je existence interakce nepřímé. Tato interakce může být zprostředkována jiným proteinem nebo nukleovou kyselinou, které fungují jako prostředník vazby a jsou v kontaktu s oběma precipitovanými proteiny, které se spolu ale nemusí vůbec fyzicky potkat. I takováto nepřímá interakce však může být a bude fyziologicky významná. Nepřímé interakce mohou být následně odhaleny hmotnostní spektrometrií precipitovaných komplexů (Phizicky a Fields, 1995).

K vysoce specifickým interakcím také může docházet přímo v buněčném lyzátu mezi proteiny, jež by se uvnitř buňky nikdy nepotkaly. Takovýto nepravdivý pozitivní výsledek může být odhalen kolokalizačními studiemi a specifickou mutagenezí, kde by mutace každého interakčního partnera měla ovlivňovat stejný proces v buňce (Phizicky a Fields, 1995).

Problémem afinitní purifikace by mohla být i její vysoká citlivost – uvádí se, že tato metoda dokáže nalézt interakce s vazebnou konstantou  $10^{-5}$  M. Hraniční hodnota vazebné konstanty pro fyziologicky významné interakce je však odhadována na  $10^{-3}$  M. Jako pozitivní výsledek mohou tedy vypadat i vazby plynoucí pouze z odlišného náboje (Phizicky a Fields, 1995).

Mnohem častěji než s falešnými pozitivy se ale u těchto metod setkáme s falešně negativními výsledky.

Kromě technických problémů může být důvodem například to, že interakci brání značky na proteinech, nebo že navázání na matrici/protilátku se vylučuje s interakcí s druhým proteinem.

Metoda bez zafixování nativního stavu také nemá šanci zachytit tranzientní interakce závislé na určitých procesech. Změnou chemických podmínek okolí proteinů během extrakce proteinů z buněk pak může docházet k disociaci i jinak stálých interakcí. Stejně tak citlivost nedostatečně optimalizované metody může být problémem, slabší interakce nemusí být nalezeny.

## 6.2 Charakterizace interakce Prp45 a Prp46

Fyzická interakce Prp46 a Prp45 byla poprvé nalezena v dvouhybridním systému (Albers *et al.*, 2003), což je metoda umožňující hledání proteinových interakcí *in vivo* (Guarente, 1993). Metoda je velmi citlivá, může ale generovat i falešně pozitivní výsledky. Na rozdíl od precipitací probíhá ve fyziologických podmínkách, fúzní proteiny jsou ale exprimovány z uměle vytvořeného vektoru. Interakce jsou touto metodou nalézány nepřímou, nejde tedy o přímý důkaz fyzického spojení proteinů.

V dvouhybridním systému byla charakterizována minimální oblast interakce Prp46 a Prp45 mezi 127. a 432. aminokyselinou Prp46 (Albers *et al.*, 2003). V této oblasti se nachází obecný motiv 7 WD repetice, který zprostředkovává protein-proteinové interakce (Smith *et al.*, 1999; Albers *et al.*, 2003).

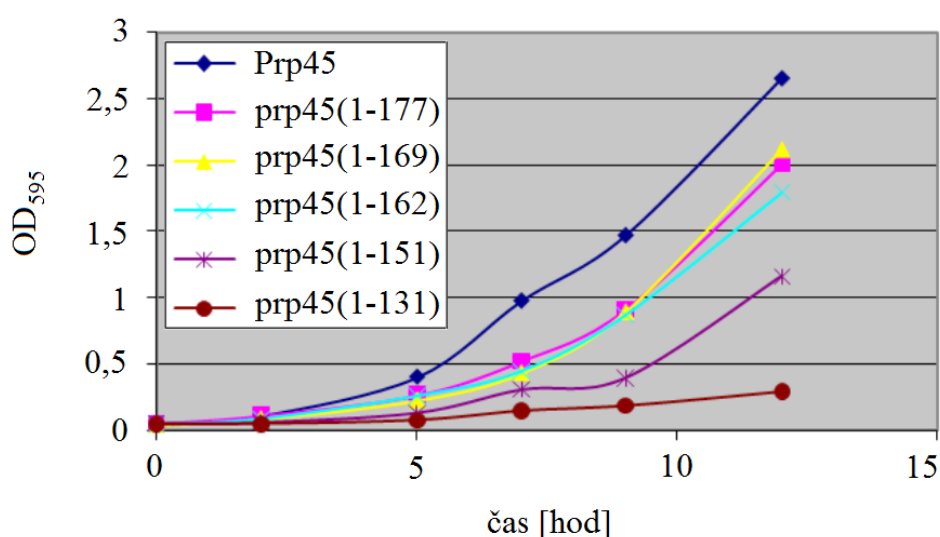
Minimální oblastí interakce s Prp46 byla po testování v dvouhybridním systému označena oblast mezi 55. a 204. aminokyselinou Prp45. Tato oblast byla zároveň sama o sobě dostatečná pro uskutečnění vazby. *In vitro* však bylo koimunoprecipitací zjištěno, že pro interakci je důležitý zejména N-konec proteinu Prp45 - fragment prp45(54-309) neinteragoval. Nejkratší testovaný fragment obsahující N-konec, prp45(1-218), se však na Prp46 vázal. Rozcházející se výsledky si autoři vysvětlovali zejména faktem, že v dvouhybridním systému jsou používány fúzní proteiny spojené na N-konci - výsledek testování interakcí v dvouhybridním systému by byl tedy zkreslen v případě, že je pro uskutečnění interakce vyžadována určitá délka sekvence v N-koncové oblasti (Albers *et al.*, 2003).

V tomto kontextu stojí za zmínku i samotný protein Prp45. Ten je esenciální (Harris *et al.*, 1992; viz kap. 2.3.1) a obsahuje 379 aminokyselin. Životaschopné jsou kvasinky nesoucí jeho zkrácené varianty prp45(53-379) nebo prp45(1-169). Zkrácení na prp45(1-169) ale způsobuje růstové defekty a teplotně senzitivní fenotyp. Další zkracování na N-konci (prp45(119-379)) je pro kvasinky letální. V případě nepřítomnosti obou konců proteinu (prp45(54-190)) jsou kvasinky také neživotaschopné. Pro svou esenciální funkci tedy protein Prp45 vyžaduje alespoň jeden kompletní konec (Gahura *et al.*, 2009), přičemž je tolerováno větší zkrácení na C-konci než na N-konci.

Expresí alely prp45(119-379), která není sama o sobě dostatečná pro přežití kvasinek, v *trans* potlačuje teplotně senzitivní fenotyp u buněk s alelou prp45(1-169). Důvodem by mohla být existence „lešení“ pro Prp45, na které se obě části proteinu naváží a mohou díky

tomu vytvořit funkční celek, nebo je Prp45 schopen homotypické interakce, kde spolu vzájemně interagují N-konec a C-konec proteinu a tato interakce podmiňuje jeho funkčnost (Gahura *et al.*, 2009).

Přestože již zkrácení proteinu na 169 N-koncových aminokyselin způsobovalo teplotně senzitivní fenotyp kvasinek, v naší laboratoři byly vytvořeny haploidní kvasinkové kmeny obsahující v genomu ještě více zkrácené verze proteinu Prp45, z nichž nejkratší byla prp45(1-131). Takové buňky rostly již výrazně pomaleji než buňky divokého typu i v permissivní teplotě, což naznačuje, že další zkracování proteinu by nejspíš bylo pro kvasinky letální (obrázek 43; K. Abrahámová, nepublikované výsledky).



Obrázek 43: Růstové křivky kvasinkových kmenů (vytvořených z rodiče EGY48, viz kapitola 3.1.2) nesoucích zkrácené verze proteinu Prp45 kultivovaných v permissivní teplotě, tedy 30 °C (upraveno dle K. Abrahámová, nepublikované výsledky).

V této práci byla blíže charakterizována interakce Prp45 a Prp46. Koimunoprecipitací bylo zjištěno, že s Prp46 interaguje i nejkratší testovaný fragment prp45(1-131). V precipitátu zkrácené verze prp45(1-131) však bylo detekováno výrazně méně proteinu Prp46, než tomu bylo v případě precipitátu fragmentů prp45(1-151), prp45(1-169) a prp45(1-177). Kompletní verze Prp45 pak váže Prp46 podstatně lépe než všechny testované zkrácené verze Prp45, jak vypovídá síla signálu Prp46 v precipitátu Prp45.

Z těchto výsledků vyplývá, že oblast důležitá a dostačující pro interakci s Prp46 se nachází v oblasti mezi 1.-131. aminokyselinou Prp45, tedy přibližně v té nejvíce C-koncově zkrácené verzi proteinu Prp45, která je ještě dostačující pro životaschopnost kvasinek. Vazby



se však zřejmě účastní i jiné oblasti proteinu, jak napovídá zjištění, že delší verze proteinu Prp45 váží Prp46 silněji. Významnou roli ve vazbě jistě hraje i C-koncová polovina Prp45, tedy oblast mezi 177. a 379. aminokyselinou, vzhledem k tomu, že rozdíl mezi silou vazby kompletního Prp45 a jeho C-koncově zkrácených verzí na Prp46 a je markantní.

Důvodem, proč nebyl nalezen protein Prp46 v precipitátu fragmentu prp45(1-162), mohlo být kromě metodické chyby v některé fázi testování také například sterické bránění takto zkráceného proteinu, který nemohl být složen klasickým způsobem, vazbě. Kratší fragmenty by tak již vazbě nebránily a delší by zase umožňovaly složení proteinu vhodné pro vazbu.

Umístění oblasti ještě dostačující pro vazbu proteinu Prp46 v esenciální části N-koncového úseku proteinu by mohlo naznačovat esencialitu samotné vazby Prp45-Prp46. Pro testování této hypotézy by bylo nutné testovat vazbu Prp45-Prp46 na N-koncově zkrácených variantách Prp45, a charakterizovat tak oblast dostačující/nutnou pro vazbu v C-koncové polovině Prp45. Následně pak pozorovat životaschopnost mutant s různými zkrácenými variantami proteinu Prp46, charakterizovat esenciální oblast tohoto proteinu a koimunoprecipitací blíže charakterizovat i oblast vazby proteinu Prp45 na Prp46.

## 6.3 Interakce Prp45 s Prp22

Při použití Prp45 jako „návnady“ se v dvouhybridním systému interakci s Prp22 najít nepodařilo. Množství nalezených izolátů Prp45 při použití Prp22 jako „návnady“ bylo ale vysoké (Albers *et al.*, 2003).

Nehledě na to, zda je minimální oblast interakce s Prp46 na N-konci proteinu Prp45 nebo mezi jeho 55. a 204. aminokyselinou, jedná se o odlišnou oblast proteinu Prp45, než která byla identifikována v dvouhybridním systému jako minimální oblast interakce s proteinem Prp22, tedy oblast mezi 262. a 291. aminokyselinou, což naznačuje odlišnost charakteru vazby Prp45-Prp46 a Prp45-Prp22 (Albers *et al.*, 2003). Hypotéza o takovéto lokalizaci interakce je podpořena i poznatkem, že právě C-koncová polovina Prp45 je nutná pro správnou interakci Prp22 se spliceosomem (viz níže; Gahura *et al.*, 2009).

Prp22 interaguje s Prp45 taktéž geneticky – některé zkrácené verze Prp22 jsou synteticky letální s prp45(1-169), mírné nabohacení proteinu Prp22 vede zase k částečnému potlačení teplotně senzitivního fenotypu v buňkách s prp45(1-169) (Gahura *et al.*, 2009).

Přímým důkazem fyziologicky významného vztahu Prp45 a Prp22 je potom nález sníženého množství Prp22 v precipitátu spliceosomu v buňkách postrádajících C-konec Prp45. Přidání exogenní alely prp45(119-379) do buněk obsahujících endogenní prp45(1-169) obsah Prp22 v precipitátech spliceosomu opět zvýšilo (Gahura *et al.*, 2009).

V této práci byla tato interakce pozorována koimunoprecipitací, byl tak poskytnut přímý důkaz fyzické interakce Prp45-Prp22. Hledání této interakce sloužilo také k vyzkoušení metody optimalizované na interakci Prp45-Prp46. Touto cestou byla demonstrována schopnost metody odhalit i slabší proteinové interakce než Prp45-Prp46. Přestože jsou totiž proteiny Prp45 a Prp22 účastníky sestřihu, nejsou součástí stejného proteinového komplexu.

## 6.4 Hledání interakcí Prp45 s regulátory transkripce

Proteiny, které byly zvoleny pro studium interakcí s proteinem Prp45, byly již dříve nalezeny v dvouhybridním systému jakožto jeho interakční partneři (Albers *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že tato metoda neposkytuje přímé důkazy o interakci, ale vypovídá o ní pouze zprostředkovaně, by však bylo vhodné pro potvrzení těchto interakcí zvolit i jiné přístupy. Fyziologický význam biochemicky potvrzených fyzických interakcí by bylo následně vhodné potvrdit také genetickou analýzou vzájemného působení obou interakčních partnerů.

Fragmenty kódující protein Yta7 byly v dvouhybridním systému při použití proteinu Prp45 jakožto „návnady“ izolovány hned několikrát. Interakce proteinu Prp45 s Yta7 je tedy velmi pravděpodobná a dle izolovaných fragmentů byl označen za minimální oblast interakce úsek mezi 835. a 1198. aminokyselinou Yta7 (Albers *et al.*, 2003).

Fragmenty proteinů Ahc1 a Vps75 byly v dvouhybridním systému při použití proteinu Prp45 jakožto „návnady“ izolovány jen jedenkrát, a jednalo se vždy o nejdelší testovaný fragment. Mohlo by se tedy jednat o interakci, kde N-konec těchto proteinů je pro vazbu esenciální (Albers *et al.*, 2003).

V případě proteinů Ngg1 a Eaf3 byl v dvouhybridním systému při použití proteinu Prp45 jakožto „návnady“ izolován jen jeden fragment, ale nejednalo se o ten nejdelší. Je možné, že existuje interakce s Prp45, pro kterou je potřeba fragment těchto proteinů určité délky, ale ne delší ani kratší (Albers *et al.*, 2003).

Interakce Prp45 s Ada2 byla nalezena v tzv. „*high throughput*“ („vysokovýkonném“) dvouhybridním systému během charakterizace rozsáhlé interakční mapy u *S. cerevisiae* (Yu *et al.*, 2008).

V této práci však nebyla ani jednou z použitých koprecipitačních metod interakce Yta7, Ahc1, Vps75, Ngg1, Eaf3 ani Ada2 s Prp45 potvrzena.

Problémem při hledání interakcí v proteinových extraktech mohl být i nízký počet exprimovaných proteinů našeho zájmu v buňce. Například v případě Ahc1 byl imunodetekcí získán poměrně nízký signál již při ověřování přítomnosti značeného proteinu ve vytvořených kmenech. Protein Ahc1 je sice exprimován v poměrně nízkém počtu kopií na buňku (viz tabulka), nejnižší exprese ze všech sledovaných proteinů je však uváděna u proteinu Yta7, u kterého problém se silou signálu v proteinových extraktech nebyl. Je však možné, že značka, kterou jsou proteiny endogenně značeny na C-konci, ovlivňuje jejich expresi.

Protein	Počet kopií na buňku
Prp45	1670
Prp46	1770
Prp22	907
Ada2	1720
Ahc1	339
Yta7	172
Ngg1	2470
Eaf3	1890
Vps75	3120

(Data získána ze Saccharomyces Genome Database [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org))

Důvodem, proč interakce nebyly pozorovány, mohlo být i to, že velmi pravděpodobně jde o interakce tranzientní – jedná se o proteiny účastníci se odlišných procesů, proto je velmi pravděpodobné, že případná interakce mezi nimi vzniká vždy jen na krátkou chvíli v určité fázi procesu genové exprese.

Tranzientní nebo velmi slabé interakce se mohou hledat koimunoprecipitací po zafixování nativního stavu proteinů a nukleových kyselin v buňce. Hledají se tak tedy interakce realizované *in vivo* a výstupem je přímý důkaz o fyzické existenci interakce. Fixaci komplexů způsobí formaldehyd, který rychle proniká do živých buněk, inaktivuje buněčné enzymy a zakonzervuje proteinové interakce existující v buňce v danou chvíli. Nevýhodou

metody mohou být možné falešně pozitivní výsledky vzniklé následkem zesíťování proteinů, které spolu neinteragují, ale jsou náhodou lokalizovány těsně u sebe. Stejně jako u běžné precipitace pak také u pozitivních nálezů může jít o nepřímou interakci zprostředkovanou jiným proteinem. Dalším problémem je, že účinnost fixace interagujících proteinů je závislá na chemickém složení interakčních povrchů, zejména na množství a umístění lysinových zbytků v oblasti interakce. To může být naopak příčinou falešně negativních výsledků (Hall a Struhl, 2002). K diskuzi výsledků získaných touto metodou ale nebude přistoupeno - metoda po zafixování buněk za podmínek v této práci nefungovala s pozitivní kontrolou, nemělo proto smysl ji používat pro hledání nových interakcí.

Metody pro testování fyzických interakcí byly úspěšně optimalizovány k poměrně vysoké citlivosti, přesto se nepodařilo nalézt žádnou interakci dokazující komunikaci spliceosomálního proteinu Prp45 s účastníky jiných kotranskripčních procesů. Důvodem mohla být ještě nedostatečná citlivost metod, tranzientní interakce, nebo neexistence těchto interakcí. V další analýze těchto interakcí se dále nabízí zejména hledat tranzientní interakce, a to fungující precipitační metodou nativně fixovaných proteinů, nebo využít celogenomové proteomické přístupy, či např. tzv. SPR (*Surface plasmon resonance*). V dalších studiích by bylo následně vhodné zaměřit se na jiné potenciální interakční partnery v oblasti regulace transkripce, a nebo na studium propojení sestřihu prostřednictvím Prp45 s jinými fázemi maturace mRNA.

## 7 Souhrn

- Byly vytvořeny dva typy kvasinkových kmenů, jež nesly vždy dva konkrétní proteiny značené odlišnými značkami – 3HA a GFP nebo GST a TAP.
- Byly vyzkoušeny dvě metody pro hledání fyzických interakcí purifikací proteinů - koimunoprecipitace a afinitní purifikace GST.
- Pomocí těchto dvou optimalizovaných metod byly hledány fyzické interakce faktorů regulujících transkripci s komponentou sestřihového aparátu, proteinem Prp45. Tyto interakce nebyly nalezeny, nebylo tedy možné určit, zda tyto interakce existují, či ne.
- Koimunoprecipitací byla potvrzena interakce sestřihových faktorů Prp22 a Prp45.
- Fyzická interakce sestřihových faktorů Prp46 a Prp45 byla pozorována jak koimunoprecipitací, tak afinitní purifikací. Koimunoprecipitací pak byla tato interakce blíže charakterizována na N-konci proteinu Prp45 testováním interakce Prp46 se zkrácenými verzemi Prp45.

## 8 Seznam použité literatury

- Abankwa, D., Millard, S. M., Martel, N., Choong, C. S., Yang, M., Butler, L. M., Buchanan, G., Tilley, W. D., Ueki, N., Hayman, M. J. & Leong, G. M. (2013). Ski-interacting protein (SKIP) interacts with androgen receptor in the nucleus and modulates androgen-dependent transcription. *BMC Biochemistry*, 14(10), 1–9.
- Agostoni Carbone, M. L., Lucchini, G., Melchiorretto, P., Nardese, V., Vanoni, M. & Panzeri, L. (1998). A 9359 bp fragment from the right arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII includes the FOL2 and YTA7 genes and three unknown open reading frames. *Yeast*, 14(6), 587–591.
- Aitken, S., Alexander, R. D. & Beggs, J. D. (2011). Modelling reveals kinetic advantages of co-transcriptional splicing. *PLoS Computational Biology*, 7(10), e1002215.
- Albers, M., Diment, A., Muraru, M., Russell, C. S. & Beggs, J. D. (2003). Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA*, 9(1), 138–150.
- Albulescu, L.-O., Sabet, N., Gudipati, M., Stepankiw, N., Bergman, Z. J., Huffaker, T. C. & Pleiss, J. A. (2012). A quantitative, high-throughput reverse genetic screen reveals novel connections between Pre-mRNA splicing and 5' and 3' end transcript determinants. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002530.
- Alexander, R. D., Barrass, J. D., Dichtl, B., Kos, M., Obtulowicz, T., Robert, M.-C., Koper, M., Karkusiewicz, I., Mariconti, L., Tollervey, D., Dichtl, B., Kufel, J., Bertrand, E. & Beggs, J. D. (2010a). RiboSys, a high-resolution, quantitative approach to measure the in vivo kinetics of pre-mRNA splicing and 3'-end processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N.Y.)*, 16(12), 2570–80.
- Alexander, R. D., Innocente, S. A., Barrass, J. D. & Beggs, J. D. (2010). Splicing-dependent RNA polymerase pausing in yeast. *Molecular Cell*, 40(4), 582–93.
- Ambrozková, M., Půta, F., Fuková, I., Skružný, M., Brábek, J. & Folk, P. (2001). The Fission Yeast Ortholog of the Coregulator SKIP Interacts with the Small Subunit of U2AF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(5), 1148–1154.
- Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C. & Komorowski, J. (2009). Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Research*. 19(10), 1732–1741.
- Ares, M. Jr., Grate, L. & Pauling, M. H. (1999). A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA (New York, N. Y.)*, 5(9), 1138–1139.
- Balasubramanian, R., Pray-Grant, M. G., Selleck, W., Grant, P. A. & Tan, S. (2002). Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7989–7995.
- Barrass, J. D. & Beggs, J. D. (2003). Splicing goes global. *Trends in Genetics*, 19(6), 295–298.
- Batsché, E., Yaniv, M. & Muchardt, C. (2006). The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(1), 22–29.
- Baudino, T. A., Kraichely, D. M., Jefcoat, S. C., Winchester, S. K., Partridge, N. C. & Macdonald, P. N. (1998). Isolation and Characterization of a Novel Coactivator Protein, NCoA-62, Involved in Vitamin D-mediated Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 16434–16441.
- Beckmann, J. S. & Trifonov, E. N. (1991). Splice junctions follow a 205-base ladder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2380–2383.

- Berger, S. L., Piña, B., Silverman, N., Marcus, G. A., Agapite, J., Regier, J. L., Triezenberg, S. J. & Guarente, L. (1992).** Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell*, 70(2), 251-265.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H. & Lu, R. (2008).** Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature*, 452(7189), 846–850.
- Beyer, A. L. & Osheim, Y. N. (1988).** Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes & Development*, 2(6), 754–765.
- Bird, G., Zorio, D. A. R. & Bentley, D. L. (2004).** RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Phosphorylation Is Required for Cotranscriptional Pre-mRNA Splicing and 3'-End Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 24(20), 8963–8969.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. & Bonifacino, J. S. (2002).** Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(7), 2486-2501.
- Boyer, L. A., Langer, M. R., Crowley, K. A., Tan, S., Denu, J. M. & Peterson, C. L. (2002).** Essential role for the SANT domain in the functioning of multiple chromatin remodeling enzymes. *Molecular Cell*, 10(4), 935-942.
- Braberg, H., Jin, H., Moehle, E. A., Chan, Y. A., Wang, S., Shales, M., Benschop, J. J., Morris, J. H., Qiu, Ch., Hu, F. *et al.* (2013).** From structure to systems: high-resolution, quantitative genetic analysis of RNA polymerase II. *Cell*, 154(4), 775–788.
- Brandl, C. J., Furlanetto, A. M., Martens, J. A. & Hamilton, K. S. (1993).** Characterization of NGG1, a novel yeast gene required for glucose repression of GAL4p-regulated transcription. *EMBO Journal*, 12(13), 5255-5265.
- Brès, V., Gomes, N., Pickle, L. & Jones, K. A. (2005).** A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes & Development*, 19(10), 1211–1226.
- Brès, V., Yoshida, T., Pickle, L. & Jones, K. A. (2009).** SKIP Interacts with c-Myc and Menin to Promote HIV-1 Tat Transactivation. *Molecular Cell*, 36(1), 75–87.
- Brody, Y., Neufeld, N., Bieberstein, N., Causse, S. Z., Böhnlein, E.-M., Neugebauer, K. M., Darzacq, X. & Shav-Tal, Y. (2011).** The *in vivo* kinetics of RNA polymerase II elongation during co-transcriptional splicing. *PLoS Biology*, 9(1), e1000573.
- Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., Shia, W. J., Anderson, S., Yates, J., Washburn, M. P. & Workman, J. L. (2005).** Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*, 123(4), 581-592.
- Corden, J. L. & Patturajan, M. (1997).** A CTD function linking transcription to splicing. *Trends in Biochemical Sciences*, 22(11), 413-416.
- Dahl, R., Wani, B. & Hayman, M. J. (1998).** The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene*, 16(12), 1579–1586.
- Darnell, J. E. (2013).** Reflections on the history of pre-mRNA processing and highlights of current knowledge: a unified picture. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(4), 443–460.
- Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M. P., Krainer, A. R., Gygi, S. P. & Reed, R. (2007).** SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 26(6), 867-81.
- David, C. J., Boyne, A. R., Millhouse, S. R. & Manley, J. L. (2011).** The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65 – Prp19 complex. *Genes and Development*, 25(9), 972–983.

- de Almeida, S. F., Grosso, A. R., Koch, F., Fenouil, R., Carvalho, S., Andrade, J., Levezinho, H., Gut, M., Eick, D., Gut, I., Andrau, J. C., Ferrier, P. & Carmo-Fonseca, M. (2011). Splicing enhances recruitment of methyltransferase HYPB/Setd2 and methylation of histone H3 Lys36. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(9), 977–983.
- de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D. & Kornblihtt, A.R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing *in vivo*. *Molecular Cell*, 12(2), 525–532.
- Dhami, P., Saffrey, P., Bruce, A. W., Dillon, S. C., Chiang, K., Bonhoure, N., Koch, Ch. M., Bye, J., James, K., Foad, N. S. *et al.* (2010). Complex exon-intron marking by histone modifications is not determined solely by nucleosome distribution. *PloS One*, 5(8), e12339.
- Diehl, B. E. & Pringle, J. R. (1991). Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I: Identification of additional transcribed regions and demonstration that some encode essential functions. *Genetics*, 127(2), 287–298.
- Düring, L., Thorsen, M., Petersen, D. S. N., Køster, B., Jensen, T. H. & Holmberg, S. (2012). MRN1 implicates chromatin remodeling complexes and architectural factors in mRNA maturation. *PloS One*, 7(9), e44373.
- Eisen, A., Utley, R. T., Nourani, A., Allard, S., Schmidt, P., Lane, W. S., Lucchesi, J. C. & Cote, J. (2001). The yeast NuA4 and Drosophila MSL complexes contain homologous subunits important for transcription regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3484–3491.
- Eberharter, A., Sterner, D. E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J. R. 3rd, Berger, S. L. & Workman, J. L. (1999). The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), 6621–6631.
- Fededa, J. P. & Kornblihtt, A. R. (2008). A splicing regulator promotes transcriptional elongation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 779–781.
- Figueroa, J. D. & Hayman, M. J. (2004). The human Ski-interacting protein functionally substitutes for the yeast PRP45 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(4), 1105–1109.
- Fillingham, J., Recht, J., Silva, A. C., Suter, B., Emili, A., Stagljar, I., Krogan, N. J., Allis, C. D., Keogh, M. C. & Greenblatt, J. F. (2008). Chaperone control of the activity and specificity of the histone H3 acetyltransferase Rtt109. *Molecular and Cellular Biology*, 28(13), 4342–4353.
- Fillingham, J., Kainth, P., Lambert, J. P., van Bakel, H., Tsui, K., Peña-Castillo, L., Nislow, C., Figeys, D., Hughes, T. R., Greenblatt, J. & Andrews, B. J. (2009). Two-color cell array screen reveals interdependent roles for histone chaperones and a chromatin boundary regulator in histone gene repression. *Molecular Cell*, 35(3), 340–351.
- Folk, P., Půta, F., Krpejšová, L., Blahůšková, A., Markoš, A., Rabino, M. & Dottin, R. P. (1996). The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*. *Gene*, 181(1-2), 229–231.
- Folk, P., Půta, F. & Skružný, M. (2004). Transcriptional coregulator SNW/SKIP: The concealed tie of dissimilar pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(6), 629–640.
- Fong, Y. W. & Zhou, Q. (2001). Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature*, 414(6866), 929–933.
- Fryer, C. J., White, J. B. & Jones, K. A. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Molecular Cell*, 16(4), 509–520.
- Furger, A., Sullivan, J. M. O., Binnie, A., Lee, B. A. & Proudfoot, N. J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes & Development*, 16(21), 2792–2799.



- Gahura, O., Abrahámová, K., Skružný, M., Valentová, A., Munzarová, V., Folk, P. & Půta, F. (2009).** Prp45 Affects Prp22 Partition in Spliceosomal Complexes and Splicing Efficiency of Non-Consensus Substrates. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106(1), 139–151.
- García, A., Collin, A. & Calvo, O. (2012).** Sub1 associates with Spt5 and influences RNA polymerase II transcription elongation rate. *Molecular Biology of the Cell*, 23(21), 4297–4312.
- Gavin, A., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M. *et al.* (2002).** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, 415(6868), 141–147.
- Gelmedin, V., Zavala-Góngora, R., Cecilia Fernández & Brehm, K. (2005).** *Echinococcus multilocularis*: Cloning and characterization of a member of the SNW/SKIP family of transcriptional coregulators. *Experimental Parasitology*, 111(2), 115–120.
- Giangrande, P. H., Hallstrom, T. C., Tunyaplin, C., Calame, K. & Nevins, J. R. (2003).** Identification of E-box factor TFE3 as a functional partner for the E2F3 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11), 3707–3720.
- Ginsburg, D. S., Govind, C. K. & Hinnebusch, A.G. (2009).** NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gcn5. *Molecular and Cellular Biology*, 29(24), 6473–6487.
- Görnemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K. & Neugebauer, K. M. (2005).** Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Molecular Cell*, 19(1), 53–63.
- Gradolatto, A., Rogers, R. S., Lavender, H., Taverna, S. D., Allis, C. D., Aitchison, J. D. & Tackett A. J. (2008).** *Saccharomyces cerevisiae* Yta7 regulates histone gene expression. *Genetics*, 179(1), 291–304.
- Grant, P. A., Duggan, L., Côté, J., Roberts, S. M., Brownell, J. E., Candau, R., Ohba, R., Owen-Hughes, T., Allis, C. D., Winston, F., Berger, S. L. & Workman, J. L. (1997).** Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & Development*, 11(13), 1640–1650.
- Grant, P. A., Schieltz, D., Pray-Grant, M. G., Steger, D. J., Reese, J. C., Yates, J. R. 3rd & Workman, J. L. (1998).** A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*, 94(1), 45–53.
- Gu, B., Eick, D. & Bensaude, O. (2013).** CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II *in vivo*. *Nucleic Acids Research*, 41(3), 1591–1603.
- Guarente, L. (1993).** Strategies for the identification of interacting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1639–41.
- Gunderson, F. Q. & Johnson, T. L. (2009).** Acetylation by the transcriptional coactivator Gcn5 plays a novel role in co-transcriptional spliceosome assembly. *PLoS Genetics*, 5(10), e1000682.
- Gunderson, F. Q., Merkhofer, E. C. & Johnson, T. L. (2011).** Dynamic histone acetylation is critical for cotranscriptional spliceosome assembly and spliceosomal rearrangements. *PNAS*, 108(5), 2004–2009.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. & Brent, R. (1993).** Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell*, 75(4), 791–803.
- Hall, D. B. & Struhl, K. (2002).** The VP16 activation domain interacts with multiple transcriptional components as determined by protein-protein cross-linking *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 46043–46050.
- Han J, Zhou H, Li Z, Xu RM & Zhang Z. (2007).** The Rtt109-Vps75 histone acetyltransferase complex acetylates non-nucleosomal histone H3. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14158–14164.

- Harris, S.D., Cheng, J., Pugh, T.A. & Pringle, J.R. (1992).** Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I. On the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *Journal of Molecular Biology*, 225(1), 53-65.
- Hérissant, L., Moehle, E. A., Bertaccini, D., Van Dorselaer, A., Schaeffer-Reiss, C., Guthrie, C. & Dargemont, C. (2014).** H2B ubiquitylation modulates spliceosome assembly and function in budding yeast. *Biology of the Cell*, 106(4), 126–138.
- Hirose, Y., Tacke, R. & Manley, J. L. (1999).** Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes & Development*, 13(10), 1234–1239.
- Hnilicová, J., Hozeifi, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T. & Staněk, D. (2011).** Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PloS One*, 6(2), e16727.
- Horiuchi, J., Silverman, N., Marcus, G. A., Guarente, L. (1995).** ADA3, a putative transcriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN5 in a trimeric complex. *Molecular and Cellular Biology*, 15(3), 1203-1209.
- Howe, K.J., Kane, C.M. & Ares Jr., M. (2003).** Perturbation of transcription elongation influences the fidelity of internal exon inclusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N. Y.)*, 9(8), 993–1006.
- Howson, R., Huh, W., Ghaemmaghani, S., Falvo, J. V, Bower, K., Belle, A., Dephoure, N., Wykoff, D. D., Weissman, J. S. & O'Shea, E. K. (2005).** Construction, verification and experimental use of two epitope-tagged collections of yeast strains. *Comparative and Functional Genomics*, 6(1-2), 2–16.
- Huh, W., Falvo, J. V, Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. & O'Shea, E. K. (2003).** Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425(6959), 686–691.
- Chanarat, S., Seizl, M. & Sträßer, K. (2011).** The Prp19 complex is a novel transcription elongation factor required for TREX occupancy at transcribed genes. *Genes & Development*, 25(11), 1147–1158.
- Chathoth, K. T., Barrass, J. D., Webb, S. & Beggs, J. D. (2014).** A splicing-dependent transcriptional checkpoint associated with prespliceosome formation. *Molecular Cell*, 53(5), 779–790.
- Chen, J., Xu, J., Zhao, W., Hu, G., Cheng, H., Kang, Y., Xie, Y. & Lu, Y. (2005).** Characterization of human LNX, a novel ligand of Numb protein X that is downregulated in human gliomas. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(11), 2273-2283.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989).** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 186(7), 2172-2175.
- Jurica, M. S., Licklider, L. J., Gygi, S. P., Grigorieff, N. & Moore, M. J. (2002).** Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, 8(4), 426–439.
- Kim, Y.-J., Noguchi, S., Hayashi, Y. K., Tsukahara, T., Shimizu, T., & Arahata, K. (2001).** The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Human Molecular Genetics*, 10(11), 1129–1139.
- Kim, S., Kim, H., Fong, N., Erickson, B. & Bentley, D. L. (2011).** Pre-mRNA splicing is a determinant of histone H3K36 methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13564–13569.
- Kocić, J., Villar, V., Krstić, A. & Santibanez, J. F. (2012).** SKIP Downregulation Increases TGF-β1-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Production in Transformed Keratinocytes. *Scientifica*, 2012, 1–8.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X. S. & Ahringer, J. (2009).** Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nature Genetics*, 41(3), 376–381.

- Kornblihtt, A. R., de la Mata, M., Fededa, J. P., Muñoz, M. J. & Nogués, G. (2004).** Multiple links between transcription and splicing. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(10), 1489–1498.
- Kornblihtt, A. R. (2015).** Transcriptional control of alternative splicing along time: Ideas change, experiments remain. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(4), 670–672.
- Kostrouchova, M., Housa, D., Kostrouch, Z., Saudek, V. & Rall, J. E. (2002).** SKIP is an indispensable factor for *Caenorhabditis elegans* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9254–9259.
- Kotovic, K. M., Lockshon, D., Boric, L. & Neugebauer, K. M. (2003).** Cotranscriptional Recruitment of the U1 snRNP to Intron-Containing Genes in Yeast, 23(16), 5768–5779.
- Kress, T. L., Krogan, N. J., & Guthrie, C. (2008).** A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Molecular Cell*, 32(5), 727–734.
- Lacadie, S. A. & Rosbash, M. (2005).** Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5'ss base pairing in yeast. *Molecular Cell*, 19(1), 65–75.
- Lacadie, S. A., Tardiff, D. F., Kadener, S. & Rosbash, M. (2006).** In vivo commitment to yeast cotranscriptional splicing is sensitive to transcription elongation mutants. *Genes & Development*, 20(15), 2055–2066.
- Leong, G. M., Subramaniam, N., Figueroa, J., Flanagan, J. L., Hayman, M. J., Eisman, J. A. & Kouzmenko, A. P. (2001).** Ski-interacting Protein Interacts with Smad Proteins to Augment Transforming Growth Factor- $\beta$ -dependent Transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18243–18248.
- Leong, G. M., Subramaniam, N., Issa, L. L., Barry, J. B., Kino, T., Driggers, P. H., Hayman, M. J., Eisman, J. A. & Gardiner, E. M. (2004).** Ski-interacting protein, a bifunctional nuclear receptor coregulator that interacts with N-CoR/SMRT and p300. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315(4), 1070–1076.
- Lim, G. H., Zhang, X., Chung, M. S., Lee, D. J., Woo, Y. M., Cheong, H. S. & Kim, C. S. (2010).** A putative novel transcription factor, AtSKIP, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis*. *The New Phytologist*, 185(1), 103–113.
- Lopez, P. J. & Séraphin, B. (1999).** Genomic-scale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice-site recognition. *RNA (New York, N. Y.)*, 5(9), 1135–1137.
- Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M. & Misteli, T. (2010).** Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* 327(5968), 996–1000.
- Makarov, E. M., Makarova, O. V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C. L., Wilm, M. & Lührmann, R. (2002).** Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5601), 2205–2208.
- Marcus, G. A., Silverman, N., Berger, S. L., Horiuchi, J. & Guarente, L. (1994).** Functional similarity and physical association between GCN5 and ADA2: putative transcriptional adaptors. *EMBO Journal*, 13(20), 4807–4815.
- Martinkova, K., Lebduska, P., Skruzny, M., Folk, P. & Puta, F. (2002).** Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *Journal of Biochemistry*, 132(4), 557–563.
- Martins, S. B., Rino, J., Carvalho, T., Carvalho, C., Yoshida, M., Klose, J. M., de Almeida, S. F., Carmo-Fonseca, M. (2011).** Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(10), 1115–1123.

- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M. & Bentley, D. L. (1997).** The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385(6614), 357–361.
- McKay, S. L. & Johnson, T. L. (2011).** An investigation of a role for U2 snRNP spliceosomal components in regulating transcription. *PloS One*, 6(1), e16077.
- Meselson, M. & Yuan, R. (1968).** DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, 217(5134), 1110–1114.
- Moabbi, A. M., Agarwal, N., El Kaderi, B. & Ansari, A. (2012).** Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), 8505–8510.
- Moehle, E. A., Ryan, C. J., Krogan, N. J., Kress, T. L. & Guthrie, C. (2012).** The yeast SR-like protein Npl3 links chromatin modification to mRNA processing. *PLoS Genetics*, 8(11), e1003101.
- Moehle, E. A., Braberg, H., Krogan, N. J. & Guthrie, Ch. (2014).** Adventures in time and space: Splicing efficiency and RNA polymerase II elongation rate. *RNA Biology*, 11(4), 313–319.
- Morris, D. P. & Greenleaf, A. L. (2000).** The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(51), 39935–39943.
- Nahkuri, S., Taft, R. J. & Mattick, J. S. (2009).** Nucleosomes are preferentially positioned at exons in somatic and sperm cells. *Cell Cycle*, 8(20), 3420–3424.
- Neubauer, G., King, A., Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., Sleeman, J., Lamond, A. & Mann, M. (1998).** Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics*, 20(1), 46–50.
- Oesterreich, F. C., Preibisch, S. & Neugebauer, K. M. (2010).** Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Molecular Cell*, 40(4), 571–581.
- Ohi, M. D. & Gould, K. L. (2002).** Characterization of interactions among the Cef1p-Prp19p-associated splicing complex. *RNA (New York, N. Y.)*, 8(6), 798–815.
- Ohi, M. D., Link, A. J., Ren, L., Jennings, J. L., McDonald, W. H. & Gould, K. L. (2002).** Proteomics Analysis Reveals Stable Multiprotein Complexes in Both Fission and Budding Yeasts Containing Myb-Related Cdc5p/Cef1p, Novel Pre-mRNA Splicing Factors, and snRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 22(7), 2011–2024.
- Park, Y. J., Sudhoff, K. B., Andrews, A. J., Stargell, L. A. & Luger, K. (2008).** Histone chaperone specificity in Rtt109 activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(9), 957–964.
- Perales, R. & Bentley, D. (2009).** “Co-transcriptionality” - the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Molecular Cell*, 36(2), 178–191.
- Peterson, M.L., Bertolino, S. & Davis, F. (2002).** An RNA polymerase pause site is associated with the immunoglobulin mus poly(A) site. *Molecular and Cellular Biology*, 22(15), 5606–5615.
- Phatnani, H.P. & Greenleaf, A.L. (2006).** Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes and Development*, 20(21), 2922–2936.
- Phizicky, E. M. & Fields, S. (1995).** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews*, 59(1), 94–123.
- Prathapam, T., Kühne, C. & Banks, L. (2001).** The HPV-16 E7 oncoprotein binds Skip and suppresses its transcriptional activity. *Oncogene*, 20(52), 7677–7685.

- Prathapam, T., Kühne, C. & Banks, L. (2002).** Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic Acids Research*, 30(23), 5261–5268.
- Pray-Grant, M. G., Schieltz, D., McMahon, S. J., Wood, J. M., Kennedy, E. L., Cook, R. G., Workman, J. L., Yates, J. R. 3rd, Grant, P. A. (2002).** The novel SLIK histone acetyltransferase complex functions in the yeast retrograde response pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 22(24), 8774–8786.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I. & Mann, M. (2002).** Large-Scale Proteomic Analysis of the Human Spliceosome. *Genome Research*, 12(8), 1231–1245.
- Ruiz-García, A. B., Sendra, R., Pamblanco & M., Tordera, V. (1997).** Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS Letters*, 403(2), 186–190.
- Saleh, A., Lang, V., Cook, R. & Brandl, C. J. (1997).** Identification of native complexes containing the yeast coactivator/repressor proteins NGG1/ADA3 and ADA2. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(9), 5571–5578.
- Sapra, A. K., Änkö, M. L., Grishina, I., Lorenz, M., Pabis, M., Poser, I., Rollins, J., Weiland, E.-M. & Neugebauer, K. M. (2009).** SR Protein Family Members Display Diverse Activities in the Formation of Nascent and Mature mRNPs *In Vivo*. *Molecular Cell*, 34(2), 179–190.
- Saumweber, H., Frasch, M. & Korge, G. (1990).** Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the *Drosophila melanogaster* Sgs-4 gene. *Chromosoma* 99(1), 52–60.
- Scott, K. L. & Plon., S. E. (2005).** CHES1/FOXN3 interacts with Ski-interacting protein and acts as a transcriptional repressor. *Gene* 359, 119–126.
- Selth, L. & Svejstrup, J. Q. (2007).** Vps75, a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12358–12362.
- Shcherbakova, I., Hoskins, A. A., Friedman, L. J., Serebrov, V., Corrêa, I. R., Xu, M.-Q., Gelles, J. & Moore, M. J. (2013).** Alternative spliceosome assembly pathways revealed by single-molecule fluorescence microscopy. *Cell Reports*, 5(1), 151–165.
- Shieh, G. S., Pan, C.-H., Wu, J.-H., Sun, Y.-J., Wang, C.-C., Hsiao, W.-C., Lin, Ch.-Y., Tung, L., Chang, T.-H., Fleming, A. B. *et al.* (2011).** H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC Genomics*, 12(1), 627.
- Schnall, R., Mannhaupt, G., Stucka, R., Tauer, R., Ehnlé, S., Schwarzlose, C., Vetter, I. & Feldmann, H. (1994).** Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex. *Yeast*, 10(9), 1141–1155.
- Schwartz, S., Meshorer, E. & Ast, G. (2009).** Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(9), 990–995.
- Schwer, B., Gross, C. H. (1998).** Prp22, a DEXH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *EMBO Journal*, 17(7), 2086–2094.
- Silverman, N., Agapite, J. & Guarente, L. (1994).** Yeast ADA2 protein binds to the VP16 protein activation domain and activates transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11665–11668.
- Sims, R. J. III, Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B. A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J. L. & Reinberg, D. (2007).** Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Molecular Cell*, 28(4), 665–676.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. & Neer, E. J. (1999).** The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(5), 181–185.

- Spies, N., Nielsen, C. B., Padgett, R. A. & Burge, C. B. (2009).** Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Molecular Cell*, 36(2), 245–254.
- Spingola, M., Grate, L., Haussler, D. & Ares, M. Jr. (1999).** Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA (New York, N. Y.)*, 5(2), 221–34.
- Sterner, D. E., Wang, X., Bloom, M. H., Simon, G. M. & Berger, S.L. (2002).** The SANT domain of Ada2 is required for normal acetylation of histones by the yeast SAGA complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 8178–8186.
- Tang, J., Chang, H. Y. & Yang, X. (2005).** The death domain-associated protein modulates activity of the transcription co-factor Skip/NcoA62. *FEBS Letters*, 579(13), 2883–2890.
- Tardiff, D. F. & Rosbash, M. (2006).** Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during in vivo spliceosome assembly. *RNA (New York, N. Y.)*, 12(6), 968–979.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcarcel, J. & Guigo, R. (2009).** Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(9), 996–1001.
- Van Driessche, B., Tafforeau, L., Hentges, P., Carr, A. M. & Vandenhouste, J. (2005).** Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast*, 22(13), 1061–1068.
- Villar, V., Kocic, J., Bugarski, D., Jovcic, G. & Santibanez, J. F. (2010).** SKIP is required for TGF- $\beta$ 1-induced epithelial mesenchymal transition and migration in transformed keratinocytes. *FEBS Letters*, 584(22), 4586–4592.
- Villar, V., Kocic, J. & Santibanez, J. F. (2013).** Skip Regulates TGF-  $\beta$  1-Induced Extracellular Matrix Degrading Proteases Expression in Human PC-3 Prostate Cancer Cells. *Prostate Cancer*, 2013, 1–7.
- Waksman, G., Kominos, D., Robertson, S. C., Pant, N., Baltimore, D., Birge, R. B., Cowburn, D., Hanafusa, H., Mayer, B. J., Overduin, M. *et al.* (1992).** Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature*, 358(6388), 646–653.
- Wang, Y., Fu, Y., Gao, L., Zhu, G., Liang, J., Gao, C., Huang, B., Fenger, U., Niehrs, C., Chen, Y.-G. & Wu, W. (2010).** *Xenopus* Skip modulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and functions in neural crest induction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), 10890–10901.
- Will, C. L. & Lührmann, R. (2011).** Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a003707.
- Winston, F., Dollard, C. & Ricupero-Hovasse, S. L. (1995).** Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, 11(1), 53–55.
- Xu, C., Zhang, J., Huang, X., Sun, J., Xu, Y., Tang, Y., Wu, J., Shi, Y., Huang, Q. & Zhang, Q. (2006).** Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase-like protein 1 and insights into its interaction with SKIP. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15900–15908.
- Yu, H., Braun, P., Yildirim, M. A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., Hirozane-Kishikawa, T., Gebreab, F., Li, N., Simonis, N. *et al.* (2008).** High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5898), 104–10.
- Yu, Y., Das, R., Folco, E. G. & Reed, R. (2010).** A model in vitro system for co-transcriptional splicing. *Nucleic Acids Research*, 38(21), 7570–8.
- Zeng, C. & Berget, S. M. (2000).** Participation of the C-terminal domain of RNA polymerase II in exon definition during pre-mRNA splicing. *Molecular and Cellular Biology*, 20(21), 8290–8301.

**Zhang, C., Baudino, T. A., Dowd, D. R., Tokumaru, H., Wang, W. & MacDonald, P. N. (2001).** Ternary Complexes and Cooperative Interplay between NCoA-62/Ski-interacting Protein and Steroid Receptor Coactivators in Vitamin D Receptor-mediated Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40614–40620.

**Zhang, C., Dowd, D. R., Staal, A., Gu, C., Lian, J. B., Wijnen, A. J. Van, Stein, G. S. & MacDonald, P. N. (2003).** Nuclear Coactivator-62 kDa/Ski-interacting Protein Is a Nuclear Matrix-associated Coactivator That May Couple Vitamin D Receptor-mediated Transcription and RNA Splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35325–35336.

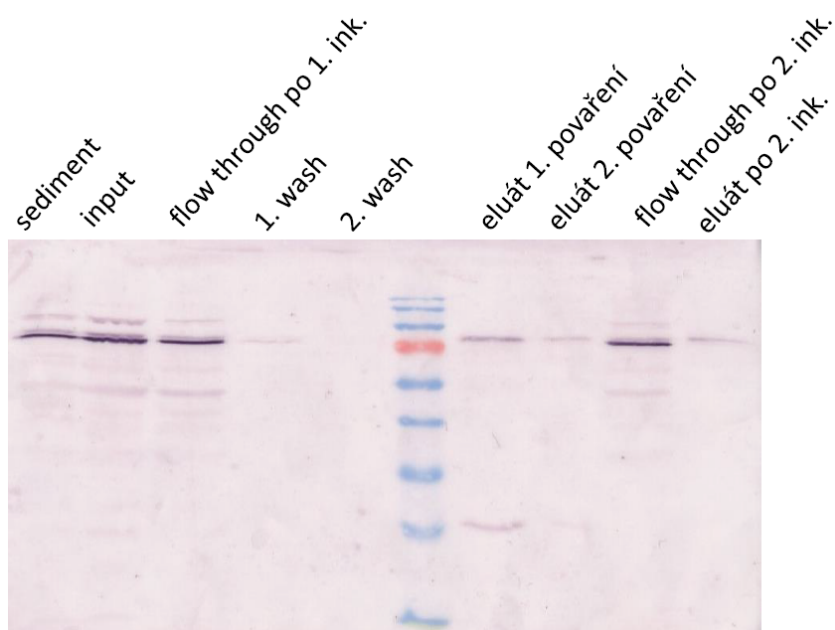
**Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L. & Hayward, S. D. (2000a).** A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *Journal of Virology*, 74(4), 1939–1947.

**Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G. & Hayward, S. D. (2000b).** SKIP, a CBF1-Associated Protein, Interacts with the Ankyrin Repeat Domain of Notch1C To Facilitate Notch1C Function. *Molecular and Cellular Biology*, 20(7), 2400–2410.

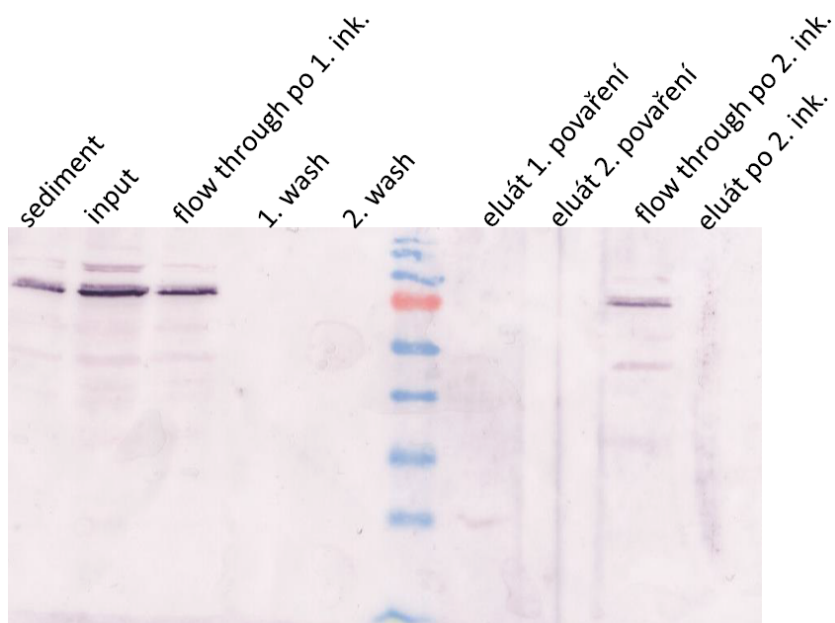
**Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P. & Reed, R. (2002).** Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419(6903), 182–185.

**Zhou, H.-L., Hinman, M. N., Barron, V. A., Geng, C., Zhou, G., Luo, G., Siegel, R. E. & Lou, H. (2011).** Hu proteins regulate alternative splicing by inducing localized histone hyperacetylation in an RNA-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(36), E627–E635.

## 9 Příloha

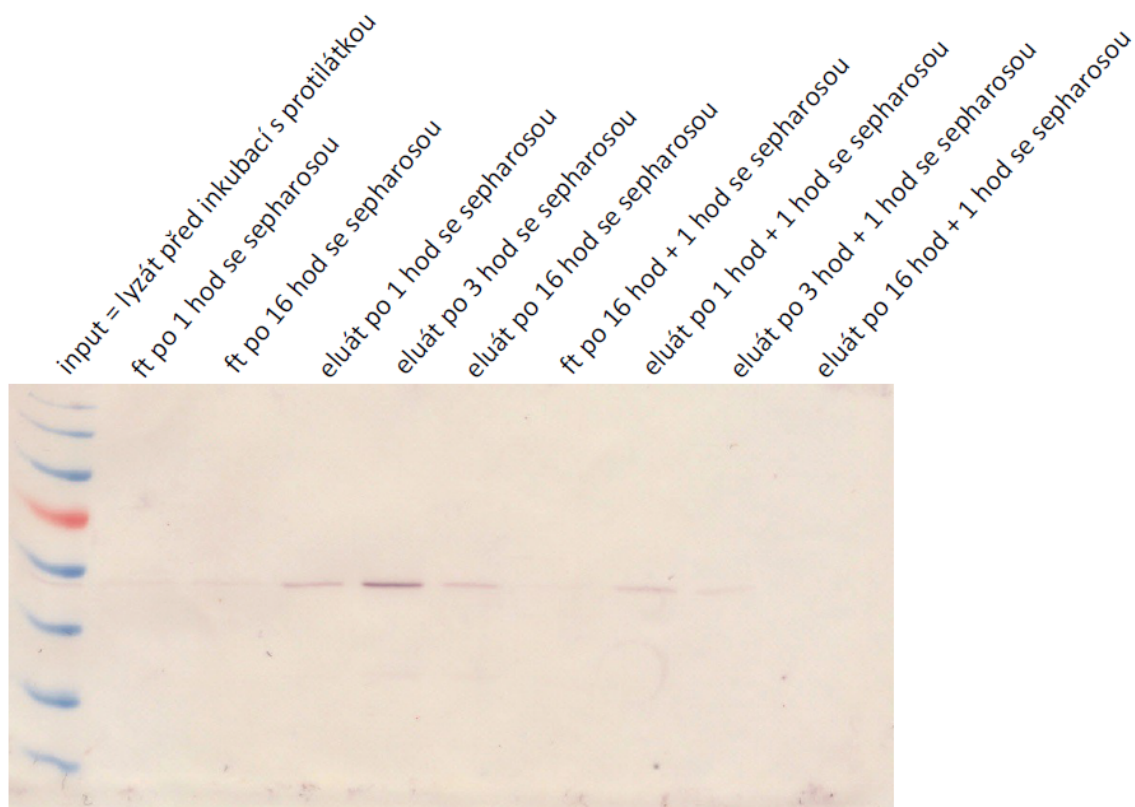


*Příloha 1: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 28.*

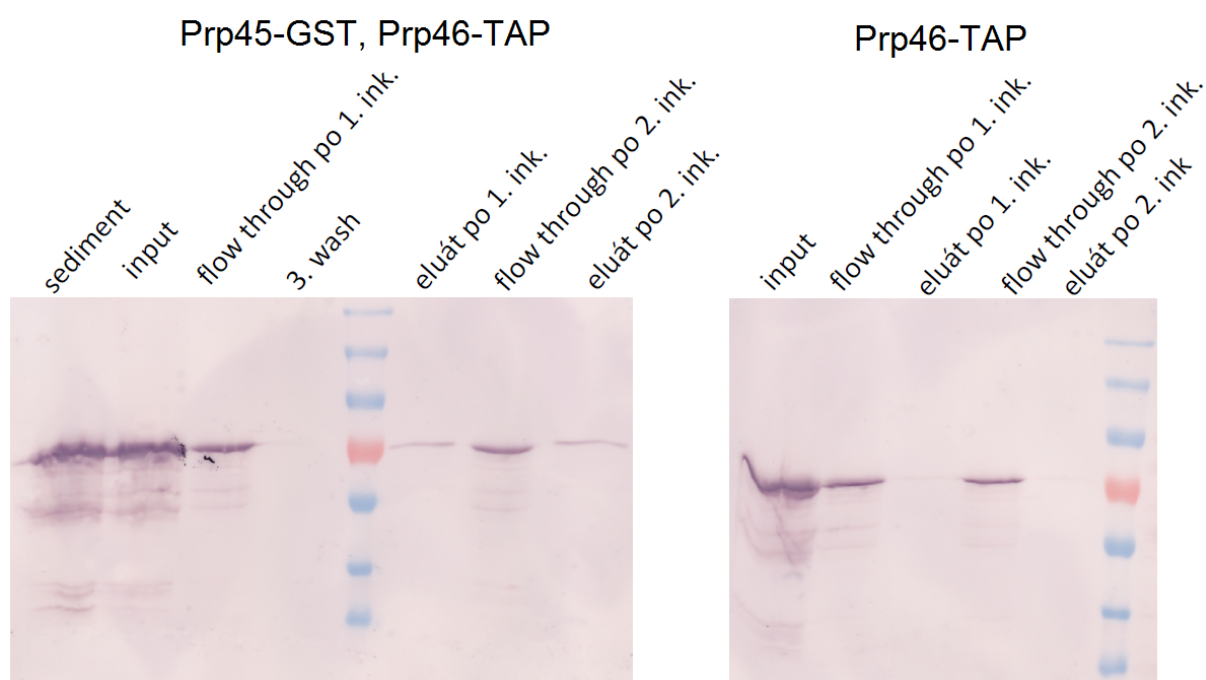


*Příloha 2: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 30.*

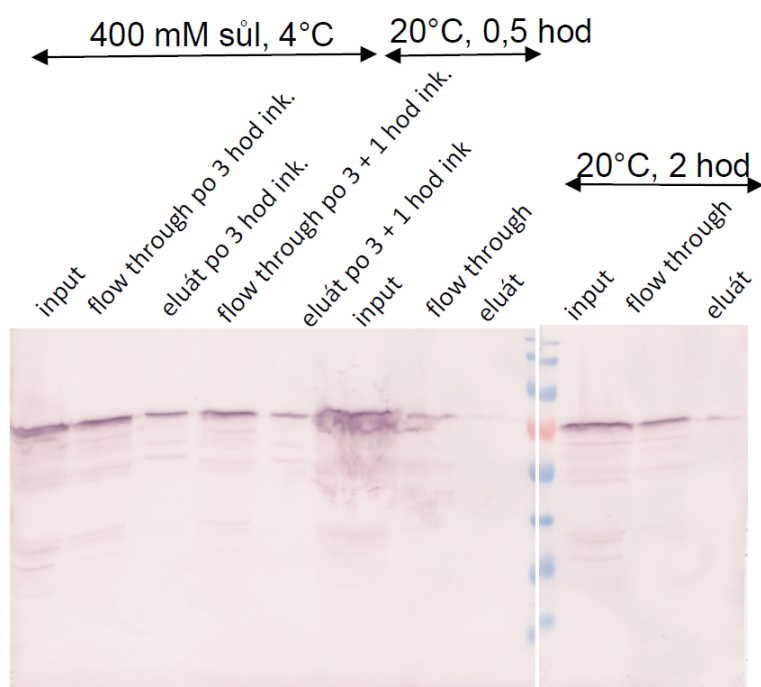




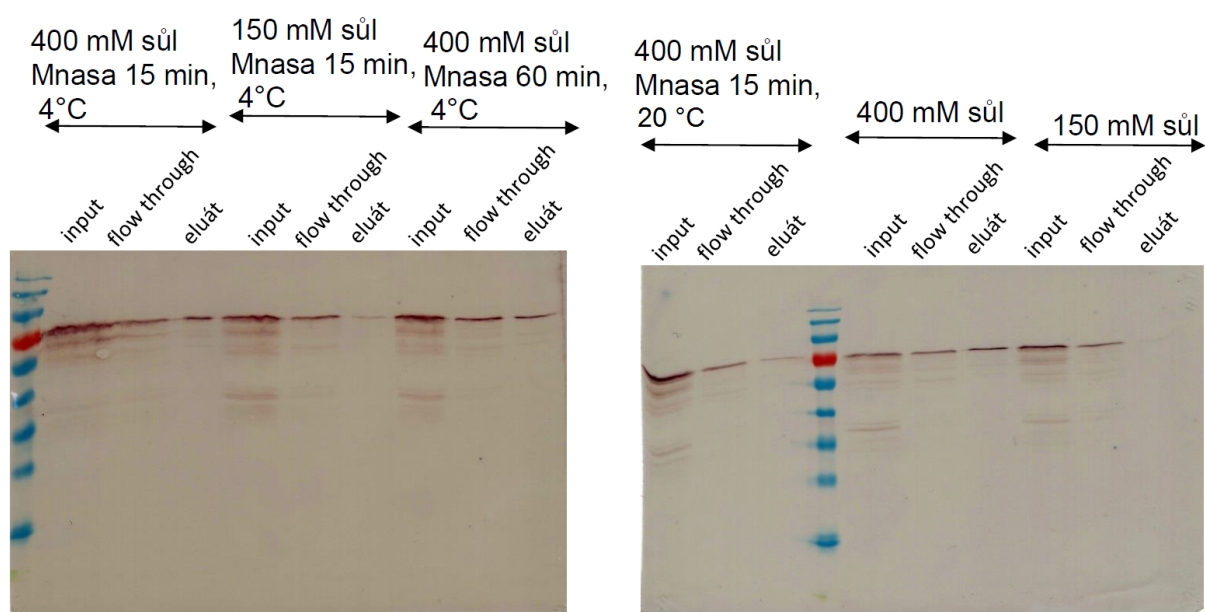
Příloha 3: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 31.



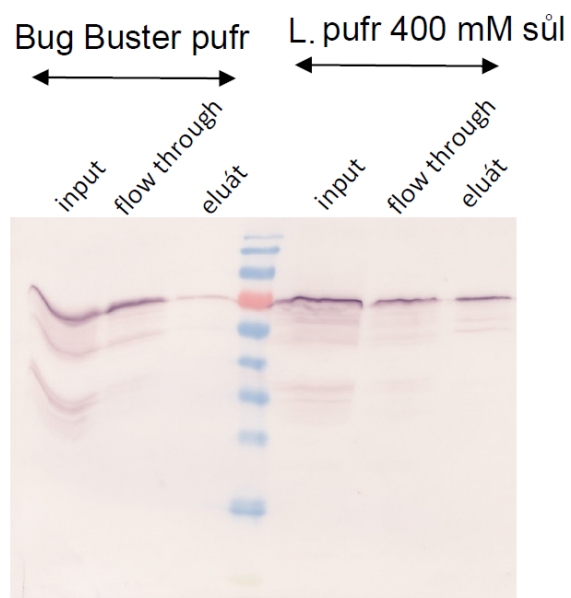
Příloha 4: Kompletní obrázky nitrocelulózových membrán použité při přípravě obrázku 32.



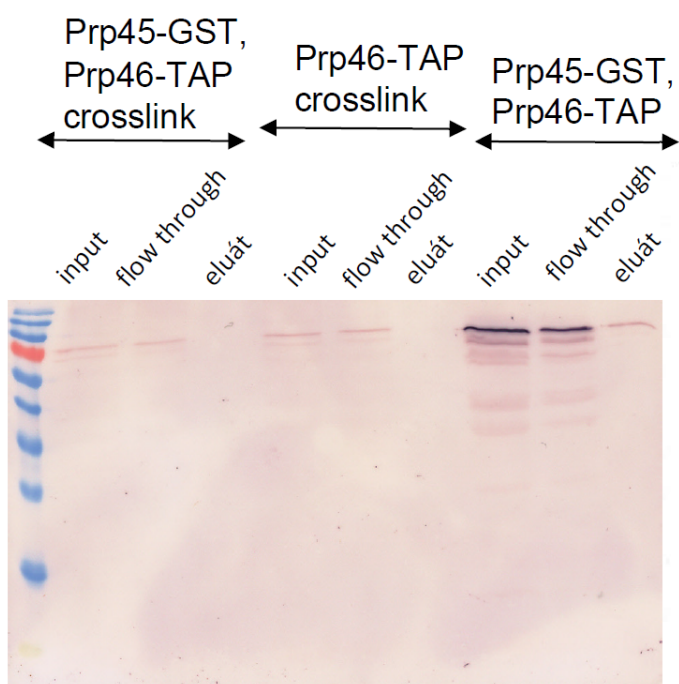
Příloha 5: Kompletní obrázky nitrocelulózových membrán použité při přípravě obrázku 33.



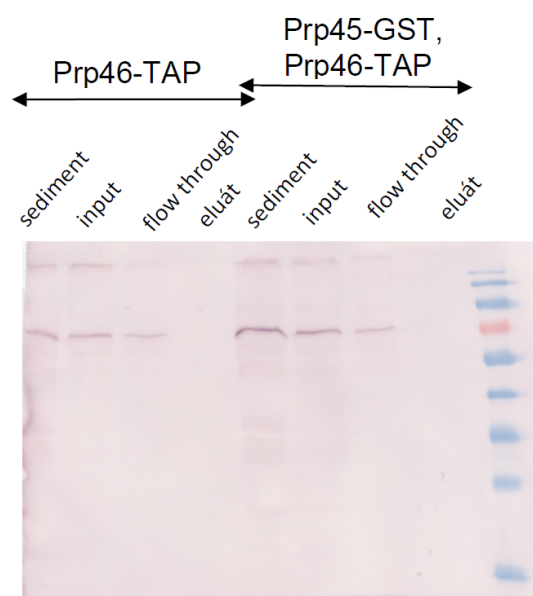
Příloha 6: Kompletní obrázky nitrocelulózových membrán použité při přípravě obrázku 35.



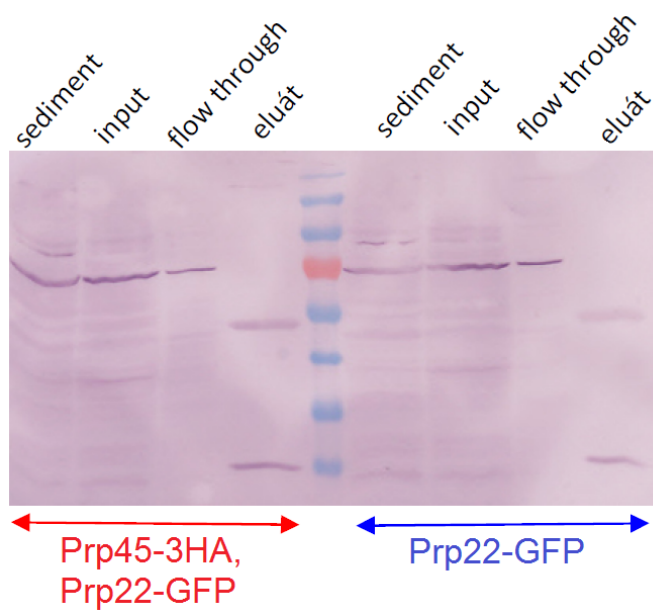
*Příloha 7: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 36.*



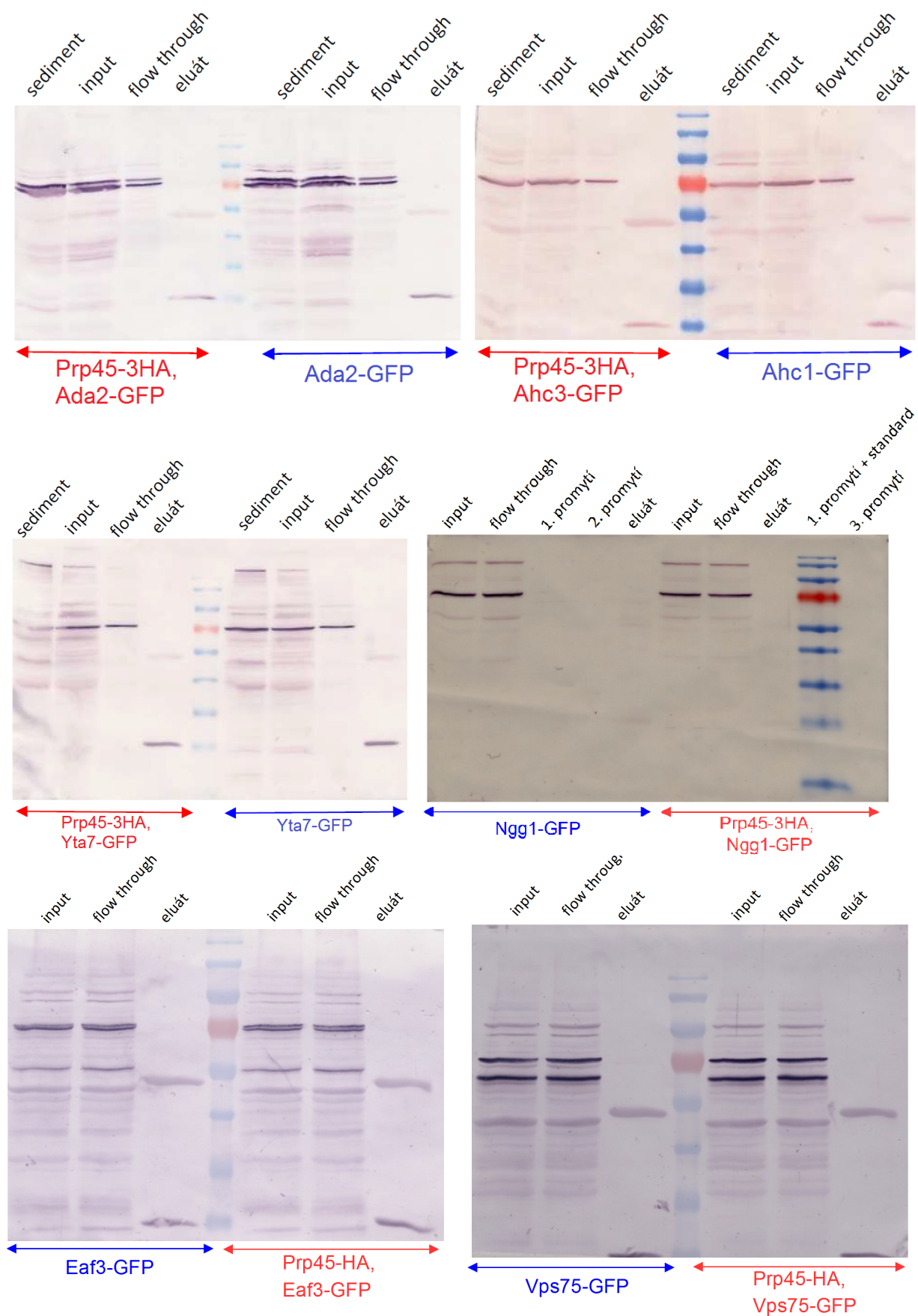
*Příloha 8: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 37.*



Příloha 9: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 38.

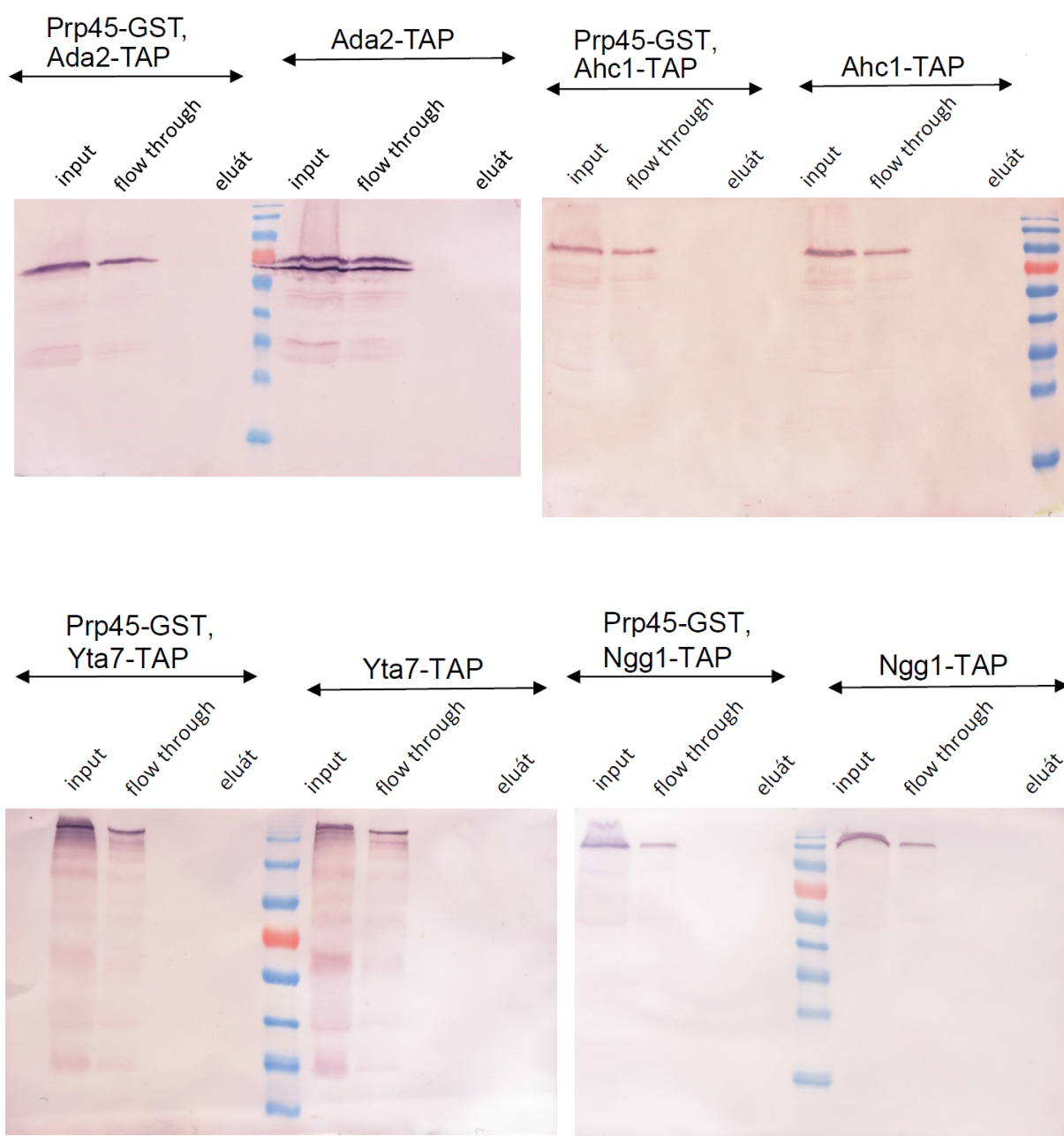


Příloha 10: Kompletní obrázek nitrocelulózové membrány použitý při přípravě obrázku 39.

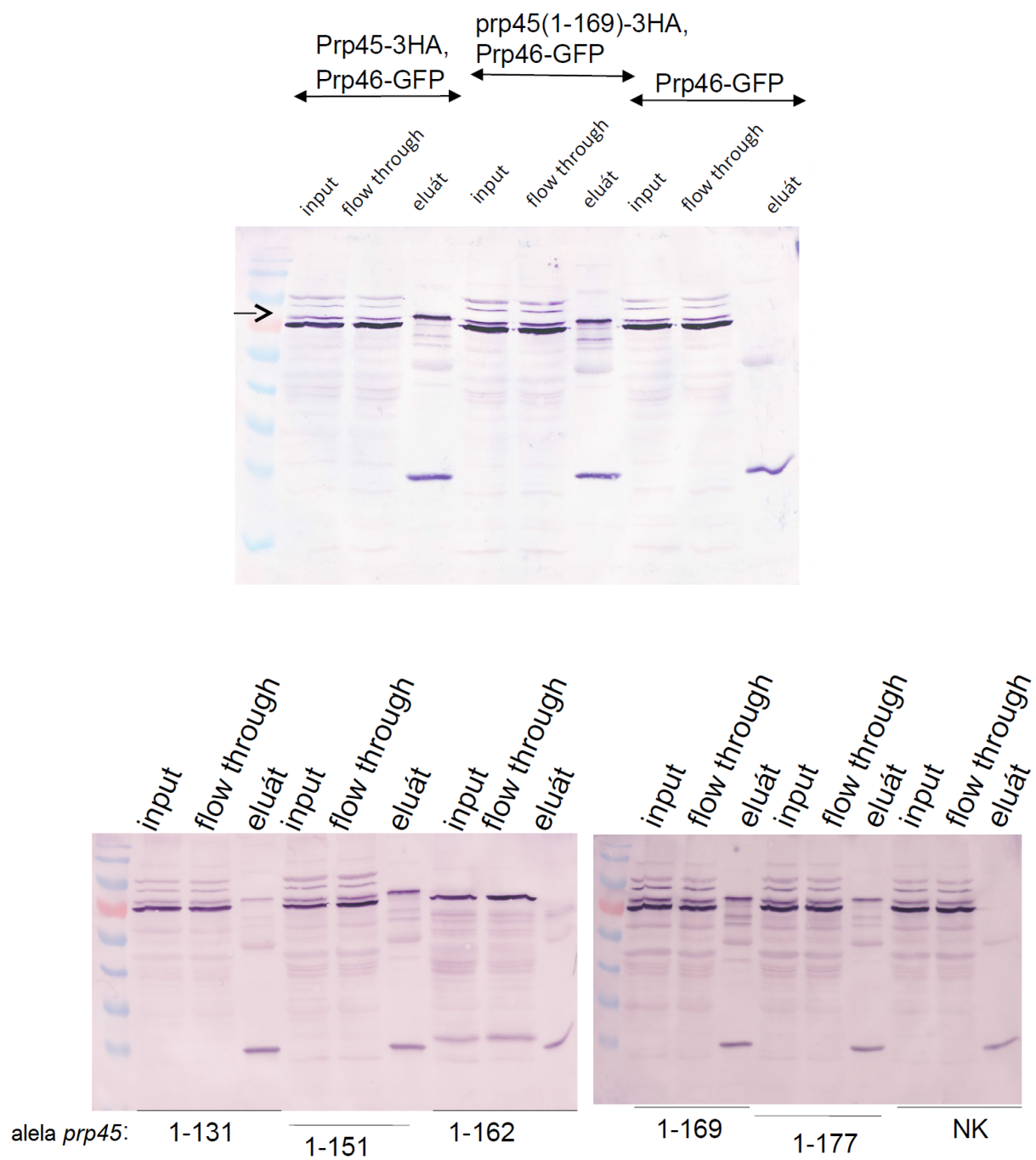


Příloha 11: Kompletní obrázky nitrocelulózových membrán použité při přípravě obrázku 40.





*Příloha 12: Kompletní obrázky nitrocelulózových membrán použité při přípravě obrázku 41.*



Příloha 13: Kompletní obrázky nitrocelulózových membrán použité při přípravě obrázku 42.